

THESIS

MUNICH

1966

THROMBOZYTENAGGLOMERATION  
UNTER DER WIRKUNG  
VON GLYKOLYSEMETABOLITEN  
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG  
DES MYOTOXINSCHOCKS

Klaus Evertz

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
300 PASTEUR DRIVE  
PALO ALTO, CALIF.





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik München

Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegl

---

THROMBOZYTENAGGLOMERATION UNTER DER WIRKUNG  
VON GLYKOLYSEMETABOLITEN UNTER BESONDERER  
BERÜCKSICHTIGUNG DES MYOTOXINSCHOCKS

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von  
Klaus Evertz  
aus München

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Referent: Prof. Dr. R. MARX  
Coreferent: Prof. Dr. H. SCHWIEGK  
Dekan: Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.1966

Meinen Eltern in  
tiefer Dankbarkeit  
gewidmet



## I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

|                                                                                                                                                                  | <u>Seite</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| I. Einleitung                                                                                                                                                    | 4            |
| II. Thrombozytenagglomeration in vitro durch ADP und deren Wiederauflösung bei Menschen- und Kaninchenthrombozyten                                               | 11           |
| A) Bestehende Befunde                                                                                                                                            | 11           |
| B) Versuchsanordnungen                                                                                                                                           | 14           |
| C) Bestätigung des Befundes, daß ADP in vitro Menschenthrombozyten agglomeriert                                                                                  | 21           |
| D) Bestätigung des Befundes, daß die durch ADP hervorgerufene Agglomeration menschlicher Thrombozyten durch Zugabe von Adenosin gehemmt werden kann              | 25           |
| III. In-vitro-Versuche mit Kaninchenthrombozyten zur Untersuchung folgender Befunde:                                                                             | 27           |
| A) Thrombozytenagglomeration durch                                                                                                                               |              |
| a) ADP und spontane Wiederauflösung der Agglomerate                                                                                                              |              |
| b) ATP                                                                                                                                                           | 27           |
| B) Hemmbarkeit der durch ADP hervorgerufenen Thrombozytenagglomeration durch Adenosin und AMP                                                                    | 27           |
| IV. Die Abhängigkeit der Thrombozytenagglomeration von der Konzentration der $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und dem Plasmafaktor bei Verwendung von ADP als Agglomerans | 34           |
| A) Vorversuch                                                                                                                                                    | 34           |
| B) Versuche mit gewaschenen Thrombozyten                                                                                                                         | 34           |
| V. Untersuchungen über die Beeinflussung der Thrombozytenagglomeration durch Heparine und Heparinoide mit Kaninchen- und Menschenthrombozyten in vitro           | 38           |
| A) Versuchsbedingungen und Methodik                                                                                                                              | 39           |
| B) In-vitro-Versuche mit thrombozytenreichem Menschenplasma unter Verwendung von Heparinoid-Geigy und ADP                                                        | 41           |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| C) Untersuchungen der agglomerationsfördernden Wirkung von Heparinoid-Geigy in Abhängigkeit von der Konzentration der im Blute vorhandenen $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit Menschenthrombozyten                                                                                               | 44 |
| D) In-vitro-Versuche mit thrombozytenreichem Kaninchenplasma unter Verwendung von Heparinoid-Geigy und ADP                                                                                                                                                                                | 46 |
| E) Zur Feststellung, ob sich die agglomerierende Wirkung von Heparinoid-Geigy und ADP auf Kaninchenthrombozyten gegenseitig verstärken                                                                                                                                                    | 50 |
| F) Untersuchungen über die Hemmbarkeit der agglomerierenden Wirkung von Heparinoid-Geigy durch Adenosin und AMP in vitro mit Kaninchenthrombozyten                                                                                                                                        | 51 |
| G) Vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit von<br>a) Chondroitinsulfat<br>b) Eleparon (Luitpoldwerke)<br>c) Heparin-Novo<br>d) SP 54 (Dr.Bene-Chemie)<br>e) Thrombozid (Dr.Bene-Chemie)<br>f) Heparin-Choay<br>g) Heparinoid-Geigy<br>auf die Thrombozytenagglomeration beim Kaninchen | 54 |
| VI. Versuche zur Feststellung der Wirkung von Heparinoid-Geigy, Heparin-Novo und Eleparon auf die Thrombozytenagglomeration in vivo beim Kaninchen unter besonderer Berücksichtigung der Wirkung von Heparinoid-Geigy                                                                     | 56 |
| A) Versuchsbedingungen                                                                                                                                                                                                                                                                    | 56 |
| B) Orientierender Versuch zur Untersuchung der Beeinflussbarkeit der Thrombozytenagglomeration durch Heparinoid-Geigy, Eleparon und Heparin-Novo in vivo beim Kaninchen                                                                                                                   | 58 |

|                                                                                                                                                                               | <u>Seite</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| C) Zur Beantwortung der Frage nach der Bildung der Agglomerate durch Injektion von Heparinoid-Geigy beim Kaninchen in vivo oder in vitro                                      | 62           |
| VII. Verhinderung und Reversibilität der durch ADP und Heparinoid-Geigy hervorgerufenen Thrombozytenagglomeration mit Ammoniumsulfatlösung in vitro mit Kaninchenthrombozyten | 71           |
| VIII. Thrombozytenagglomeration im Myotoxinschock                                                                                                                             | 78           |
| A) Versuchsbedingungen                                                                                                                                                        | 78           |
| B) Bestätigung schon bestehender Befunde                                                                                                                                      | 81           |
| C) Laboruntersuchungen des Myotoxins, sowie Frischmuskelextrakt und Perchlorsäureextrakt aus frischer Muskulatur                                                              | 86           |
| D) Thrombozytenagglomeration in vitro unter der Wirkung von Myotoxin                                                                                                          | 87           |
| E) Injektion von ADP, ATP und ADP + ATP beim Kaninchen                                                                                                                        | 97           |
| IX. Diskussion                                                                                                                                                                | 100          |
| X. Zusammenfassung                                                                                                                                                            | 108          |
| XI. Literaturangaben                                                                                                                                                          | 112          |

## I. Einleitung

FREUND (1) prägte 1920 den Ausdruck "Frühgift", dem er den des "Spätgiftes" gegenüberstellte. Er fand nämlich, daß die Giftigkeit toxisch wirkender Substanzen frisch defibrinierten Blutes (= "Frühgift") nicht konstant ist, sondern sich mit der Zeit, die seit der Gerinnung verflossen ist, sowohl quantitativ als auch qualitativ ändert: Die intravenöse Injektion frisch defibrinierten (auch körpereigenen) Blutes (= "Blutfrühgift")<sup>1</sup> wirkt beim Kaninchen augenblicklich tödlich, - Älteres (um Stunden bis zwei Tage!) Blut (= "Spätgift") dagegen nicht. Frühgift wirkt nach FREUND vasodilatatorisch und auf die Herzfunktion hemmend, - Spätgift soll dagegen vasokonstriktorisch und am Herzen digitalisähnlich wirksam sein. FREUND nahm nach seinen Versuchen an, daß die Gifte im defibrinierten Blut durch Zerfall von Blutplättchen entstehen. Während der Autor von Frühgift lediglich in Bezug auf frisch defibriniertes Blut spricht, findet sich in der Arbeit über "Die Entlarvung der Frühgifte" von LENGGENHAGER (2) eine (in Bezug auf das Vorkommen desselben) etwas weiter gefaßte Definition: "Man versteht darunter einen äußerst toxischen Stoff, der in ganz frisch defibriniertem Blute wie auch in ganz frischem Muskelpreßsaft vorkommt", und der in entsprechenden Dosen beispielsweise Kaninchen intravenös injiziert, den Tod sofort herbeiführt. LENGGENHAGER hat demnach den Begriff "Frühgift" auf ganz frische Muskelpreßsäfte ausgedehnt, bzw. die dabei auftretenden Toxine ihm gleichgesetzt.

LENGGENHAGER schreibt den Frühgiften eine ursprüngliche Bedeutung bezüglich der postoperativen Thrombose zu, indem sie Blutdrucksenkung, Endothelalterationen und Plättchenagglutinationen hervorriefen. LENGGENHAGER verwendet hier, wie auch im folgenden, für das Zusammenballen von Thrombozyten noch den Ausdruck "Agglutination". Nach einem Vorschlag von MARX (3) sollte besser dafür das Wort "Agglomeration" und "Agglutination" für die Immunagglutination reserviert bleiben. Zunächst aber konnte LENGGENHAGER ja noch keine Aussage darüber machen, auf welcher Basis von ihm beobachtete Thrombozytenzusammenballungen zustande gekommen waren.

KÖNIG (4) beschrieb 1934 eine Plättchenverminderung im Blut nach Operationen, unfallbedingter Traumatisierung und intravenöser Injektion von Brandblaseninhalt beim Kaninchen. Er schrieb diese Wirkung der von ZIPF und WAGENFELD (5) 1930 nach Gewebszertrümmerungen im Blut in erhöhter Konzentration auftretenden Adenylsäure (= Adenosinphosphorsäure = Adenosin - 5' - Monophosphorsäure) zu. Durch Kernzerfall (verschiedener Ursachen) soll also (außer vielleicht noch anderer Stoffe wie z.B. Xanthin oder Guanosin) Adenylsäure frei werden, die den Plättchenschwund im Blut, Veränderungen der Gerinnbarkeit des Blutes im Sinne einer Erhöhung derselben und die Kreislaufsymptome (Senkung des Blutdrucks, Hemmung der Herzstätigkeit) hervorruft. - Auf die Adenylsäure soll jedoch erst später eingegangen werden.

In seinen Untersuchungen meinte LENGGENHAGER (2) das Thrombin als das Frühgift entlarvt zu haben. Auch der Thrombokinase schreibt dieser Autor toxische Wirkung zu. Durch gerinnungshemmende Stoffe, wie Hirudin oder Heparin vermochte LENGGENHAGER die Toxizität aufzuheben. Den durch Frühgift auftretenden Tod führte er auf "intravasale Gerinnungsbildung mit Embolisierung der verschiedenen Organe" zurück. "Eine partielle Gerinnung" erblickte LENGGENHAGER bei Applikation kleiner Dosen des von ihm hergestellten Frühgiftes in "Plättchenagglutinationen".

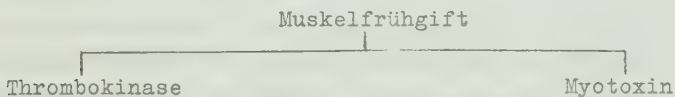
Bei Anwendung letaler Dosen hatte er nämlich starke Blutfülle im kleinen Kreislauf gefunden, - ein Befund, der von anderen Autoren (s.u.) bestätigt werden konnte.

DYCKERHOFF und SCHÖRCHER (6) überprüften die von LENGGENHAGER gemachten Aussagen über die Natur und Wirkungsweise der Frühgifte. Sie bestätigten:

1. Muskelpreßsaft, in entsprechenden Dosen intravenös injiziert, rief bei Kaninchen den Tod herbei.
2. Die Tiere kamen unter den äußeren Anzeichen der Erstickung ad exitum.
3. Ihre Sektionsbefunde waren diesselben wie bei LENGGENHAGER.
4. Die Toxizität der Frühgifte war durch gerinnungshemmende Mittel (wie z. B. das Heparinpräparat 'Vetren' der Firma Promonta)hemmbar.

DYCKERHOFF und MARX (7) unterschieden zwischen Frühgift in frisch defibriniertem Blut und in frischem Muskelextrakt. Die von den Autoren gemachten Versuche wurden an Kaninchen mit Kaninchen- und Rinderserum durchgeführt: Frisches Serum, das durch kräftiges Rühren und damit Defibrinieren von Venenblut hergestellt und sofort intravenös Kaninchen injiziert wurde, kam tödliche Wirkung zu. (Die intravenöse Injektion von Plasma wurde dagegen wirkungslos vertragen!). Dabei wurde festgestellt, daß vorwiegend Thrombin und Blutthrombokinase wichtige Komponenten in dem toxischen System seien. Wie schon einmal erwähnt, muß zwischen Muskelfrühgift und dem Frühgift in frisch defibriniertem Blute in Bezug auf seine toxischen Komponenten unterschieden werden, weil im Muskel zwar Thrombokinase, jedoch kein Thrombin vorkommt. So konnten DYCKERHOFF und SCHÖRCHER (6) nicht oder nur einschränkend folgendes bestätigen:

1. Frühgift sei identisch mit Thrombin: Durch Einwirkenlassen von frischem, tödlich wirkendem Muskelextrakt auf Fibrinogen, bzw. Magnesiumsulfatplasma konnte keine Gerinnung hervorgerufen werden.
  2. Da jedoch bei der Sektion der durch Frühgift getöteten Tiere jene schon beschriebene Embolisierung beobachtet und in allen Muskelextrakten Thrombokinase gefunden worden war, bestand auch bei DYCKERHOFF und SCHÖRCHER die Vermutung, daß der Thrombokinase selbst toxische Eigenschaft zukäme. Während die Gesamttoxizität der Muskelextrakte stets sehr schnell abnahm, (was LENGGENHAGER auch schon festgestellt hatte), war die Thrombokinase nach Feststellen des Fehlens der Toxizität noch in praktisch unverminderter Aktivität vorhanden. Hoden- und Strumaextrakte, die besonders thrombokinasereich sind und denen LENGGENHAGER auch toxische Wirkung zugeschrieben hatte, wurden generell relativ gut vertragen.
- Daß nicht der Thrombokinase a l l e i n die toxische Wirkung in einem Muskelpreßsaft zukommt, konnte DYCKERHOFF (8) noch auf andere Weise zeigen: Muskulatur von Versuchstieren wird ganz frisch, - also sofort post mortem -, durch einen Fleischwolf gedreht, in Azeton eingebracht und in Azeton und Äther getrocknet. Daraus kann durch Kochen ein Extrakt hergestellt werden, der noch löslich, aber frei von Gewebsthrombokinase ist. Die lösliche Substanz des Kochextraktes nach Abtrennen der Thrombokinase nannte DYCKERHOFF (8) "M y o t o x i n". Er sah also im Frühgift ein toxisches System, das er seiner Meinung nach in zwei Komponenten zerlegt hatte.



Wurde eine bestimmte Menge des sogenannten "Myotoxins" in Wasser gelöst und einem Kaninchen in die Ohrvene injiziert, so starb dieses, (dosis letalis 30 - 100 mg/kg Körpergewicht), auch unter den Anzeichen des Erstickens. Bei der sofort nach Eintritt des Todes durchgeführten makroskopischen Sektion fand sich jedoch keine Embolisierung in kleinen Kreislauf mehr, sondern nur eine starke Blutfülle, wie sie schon LENGGENHAGER (2) beobachtet hatte. Eine genauere histologische Untersuchung wurde von DYCKERHOFF nicht vorgenommen. Außerdem war es aber so, daß, wenn man dem Myotoxin wiederum etwas Thrombokinase zusetzte, geringere Mengen von Myotoxin ausreichten, ein Tier zu töten, als ohne Thrombokinase. Mit Thrombokinase trat dann wiederum starke Gerinnungsbildung im kleinen Kreislauf ein. Dieses oben gezeigte Schema von DYCKERHOFF über Muskelfrühgift, Myotoxin und Thrombokinase hat also insofern seine Berechtigung, als zwar Thrombokinase in das System des Frühgiftes hineingehört, diese jedoch die Toxizität von Myotoxin lediglich erhöht, ohne selbst in bestimmten Dosen tödlich zu wirken. Nach MARX (3) ist kritisch zu der Vorstellung von DYCKERHOFF zu sagen, daß Myotoxin teilweise ein Artefakt sein könnte, jedenfalls in seiner Eiweißkomponente. Zur Erklärung des Frischmuskelfgiftes kann es nur mit Vorsicht herangezogen werden. Doch dürfte seiner Meinung nach auch dieses teilweise artefizielle System als "Verbrennungsgift" bei Verbrennungen und Verbrühungen von ganz besonderem Interesse sein.

Die Vermutung KÖNIGS (4), daß die Toxizität der Frühgifte eventuell der Adenosinphosphorsäure zuzuschreiben ist, wird von LENGGENHAGER (2) als unberechtigt angesehen, da er gefunden hat, daß die von ihm hergestellten Frühgifte durch Erhitzen auf 60°C die Toxizität verloren hatten, während Adenosinphosphorsäure dadurch, daß sie hitzestabil ist, erhalten geblieben war. Außerdem begründet LENGGENHAGER das damit, daß er sagte, die Adenosinphosphorsäure sei "viel weniger toxisch als die Frühgifte". Dadurch ist m. E. eine Beteiligung der Adenosin-

phosphorsäure am toxischen System des Frühgiftes bzw. auch des Myotoxins, (denn auch dieses muß bisher noch in Unkenntnis seines chem. Aufbaues als ein Gemisch vielleicht mehrerer toxisch wirkender Substanzen aufgefaßt werden), noch nicht ausgeschlossen. Weiß man doch heute sicher, daß in Muskulatur ADP und ATP in relativ hohen Konzentrationen als Glykolysemetaboliten zur Energieversorgung derselben vorhanden sind. Daß Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein von freiem ADP im Blut oder Plasma und einer auftretenden Thrombozytenagglomeration bestehen, ist seit den Untersuchungen von KERBY und TAYLOR (11), HELLEM (12) und BORN (13) hinreichend experimentell gesichert. Von GOSSENS und GASTPAR (10) wurde 1955 im Zusammenhang mit der Frage eines Einflusses des Roßkastanienextraktes 'Venostasin' auf "die Blutgerinnung" Erwähnung getan. Die beiden letztgenannten Autoren verwendeten Myotoxin als "Kreislaufdepressor" in ihrem Test.

Aus den Anleitungen zur Herstellung des Frühgiftes bzw. des Myotixins ist zu entnehmen, daß zuerst immer die Muskulatur gewaltsam zerstört werden muß. Dies kann als der Modellfall für eine unfallbedingte Muskelzerquetschung angesehen werden, wie sie z. B. im Krieg bei durch Bombenangriffen Verschütteten auftreten.

Die in den Nierentubuli einer 'Crushniere' zu findenden Myoglobinzylinder sind auch ein Hinweis für die stattgehabte Zerstörung von Muskelzellen. Ebenso bei Unfallverletzten des Straßenverkehrs bietet sich oft das Bild von ausgedehnten Muskelzertrümmerungen vor allem der unteren Extremitäten. Das klin. Bild des traumatischen Schocks ist so gut wie in allen Fällen die Folge. Dabei drängt sich dem Betrachter geradezu die Frage auf, welche Rolle dem eventuell entstandenen Muskel-  
frühgift in dem sich hier abspielenden Schockgeschehen zukommt. Erscheint es doch merkwürdig, daß z. B. eine Patientin, deren Oberschenkelmuskulatur nur eines Beines durch einen Autounfall

stark gequetscht worden war, ohne Fraktur des Femur, - sonst keinerlei Verletzungen aufweisend, schon eine Stunde nach dem Unfall ad exitum letalem kam.

Wie wirkt das sogenannte Myotoxin, über dessen chem. Eigenschaften wir seit den Untersuchungen von DYCKERHOFF und SCHÖRCHER bisher nicht mehr wissen, als daß es positive Eiweißreaktionen und positive Fehlingsche Reaktion zeigt?

Bei der von MARX angeregten Untersuchung der Wirkung des Myotoxins, ohne weiter auf seine chem. Struktur eingehen zu wollen, schien folgendes bemerkenswert:

1. Es wurde berichtet, daß nach Injektion von Myotoxin das Tier zwar auch unter den Anzeichen der Erstickung starb, im kleinen Kreislauf, wie aus der Literatur sinngemäß nicht anders zu entnehmen ist, nun, im Gegensatz zu den Sektionsbefunden nach Muskel- und Blutfrühgiftinjektion, makroskopisch sich keine Embolisierung finden ließ. Für das Auftreten dieser Erscheinungen lassen sich folgende Möglichkeiten in Erwägung ziehen:
  - a) Direkte toxische Schädigung des Herzens bzw. des ZNS durch Myotoxin,
  - b) multiple Mikroembolisierung der Lungenkapillaren durch Thrombozytenagglomerate mit nachfolgender Lähmung des Atemzentrums durch Hypoxie. (Eine Arbeit von KEESEN (14), in der er die Ergebnisse über durch Glasperlen künstlich hervorgerufene Lungenembolien bei Kaninchen darstellt, gab mir außerdem noch Anlaß zu dieser Vermutung).
  - c) Kombination von a) und b).

2. Es bestand die nicht ganz unberechtigte Vermutung, daß sich im Myotoxin ADP befindet, da diese auch recht reichlich im Muskel vorkommt.
3. Aus dem Wissen, daß ADP Thrombozyten sowohl in vitro als auch in vivo agglomerieren lassen, (HELLEM (12), BORN (13), NORDÖY (15) wurde die Annahme einer multiplen Mikroembolisation im kleinen Kreislauf noch wahrscheinlicher gemacht.

Um die mit Myotoxin und Thrombozyten durchgeführten Versuche im Hinblick auf einen eventuell auftretenden Gehalt an ADP besser deuten zu können, werden zuerst schon bestehende Befunde über die Wirkung von ADP auf Thrombozyten durch entsprechende Versuche reproduziert.

## II.

Thrombozytenagglomeration in vitro durch ADP  
(Adenosin - 5' - Diphosphorsäure) und deren  
Wiederauflösung bei Menschen- u. Kaninchen-thrombozyten

### A) Bestehende Befunde:

1956 konnte BORN (16) zeigen, daß Thrombozyten ATP in außerordentlich hoher Dosis enthalten. Dieses ATP (Adenosin - 5' - - Triphosphorsäure) verschwindet sehr schnell, wenn die Blutplättchen in Plasma suspendiert sind, das gerinnt oder wenn überhaupt Thrombozyten die visköse Metamorphose eingehen.

HELLEM und Mitarbeiter (12) fanden 1961 bei der Untersuchung von 22 Nucleotiden, die aus einem HämolySAT gewonnen worden waren, daß den Natriumsalzen von ATP, ADP und Desoxyadenosindiphosphat nach deren papierelektrophoretischen Reinigung thrombozytenagglomerierende Wirkung zukommt. Dabei zeigte es sich, daß dem ATP eine ungleich schwächere Wirkung als dem ADP zu eigen ist. (Das Desoxyadenosindiphosphat soll in den weiteren Betrachtungen außer Acht gelassen werden.) Zehn Jahre vor HELLEM, nämlich 1951 fand schon ØLLGAARD (17) im Laufe seiner Untersuchungen der Funktion und Agglomerierbarkeit der Thrombozyten im Extrakt durch Kochen zerstörter Erythrozyten einen Faktor, der die Agglomeration der Thrombozyten beschleunigt.

Daß die Thrombozyten-Adhäsion besonders von den Erythrozyten abhängig ist, stellte MARX und HUBRICH (19) in einer Arbeit fest, die kurz vor der oben erwähnten Arbeit HELLEMS fertiggestellt wurde. MARX konnte dies dadurch zeigen, daß die Thrombozyten-Adhäsion (an fremden Oberflächen und untereinander) stieg, "wenn man plättchenhaltiges Citratplasma wieder mit seinen Erythrozyten vereinigte". Schon im August 1958 erschien zu diesem Thema von HUBRICH (19), einer Doktorandin von MARX, eine Untersuchung. Im September 1958 erfolgte zu demselben Thema HELLEMS erste Publikation (20).

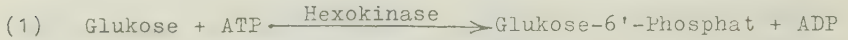
1962 wurde von BORN (21) vermutet, daß, wenn dieser Schwund an ATP auch jenes ATP einschließt, welches sich auf der Thrombozytenoberfläche befindet, eine Minderung der negativen Oberflächenladung erfolgt. Durch diese Verringerung der negativen Oberflächenladung würde die Tendenz der Thrombozyten, miteinander zu verkleben, erhöht. "Seit man annehmen kann, daß ADP von den Thrombozyten abgegeben wird, wann immer die Konzentration des in ihnen vorhandenen ATP's abnimmt, kann es sehr gut so sein, daß die Zunahme der Klebrigkeit und die Agglomeration der Thrombozyten in der

Initialphase der Blutgerinnung durch ADP hervorgerufen wird". Durch Zugabe von ADP zu thrombozytenreichem Plasma kann die Tendenz der Thrombozyten, an fremden Oberflächen zu haften und miteinander zu verklumpen, erhöht werden. BORN (13) bewies das anhand von Versuchen, in denen er zu thrombozytenreichem Plasma vom Menschen ADP in Dosen zwischen  $1 \times 10^{-6}$  und  $1 \times 10^{-7}$  Mol/ml gab. Dabei maß er die Abnahme der optischen Dichte des Plasmas, durch Thrombozytenagglomeration hervorgerufen, photometrisch. Zugleich stellte er fest, daß das Ausmaß der Agglomeration dosisabhängig und die Agglomeration zum größten Teil nach gewisser Zeit spontan reversibel ist. Ferner wurde bemerkt, daß durch Hinzufügen von AMP (Adenosin - 5' - Monophosphat) in der gleichen molaren Konzentration wie ADP zu Plasma, die durch ADP hervorgerufenen Agglomerationen nicht so stark und auch schneller reversibel ist. BORN schreibt dem AMP antagonistische Wirkung zum ADP zu.

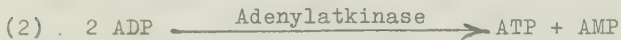
1963 gab BORN (22) an, daß er in in-vitro-Versuchen eine Hemmbarkeit der ADP-Wirkung auf die Thrombozytenagglomeration durch Adenosin festgestellt hatte. Dabei wirkt das Adenosin, in gleicher Konzentration wie AMP und ADP, stärker als AMP. Dies wurde mit thrombozytenreichem Plasma von Menschen und Schweinen beobachtet.

KERBY und TAYLOR (11) stellten in einer 1964 veröffentlichten Arbeit fest, daß die Thrombozytenagglomeration nicht von der Konzentration an ADP im Plasma allein, sondern auch von dem Verhältnis AMP/ADP abhängig ist. Je mehr dieser Quotient zugunsten von AMP verschoben wird (durch eine Adenylatkinase), desto weniger kommt das ADP zur Wirkung, da seine Konzentration dabei abnimmt. Folgende Reaktionen nehmen die Autoren an:

Zunächst Bildung von ADP, die sowohl im Plasma (bei Hinzufügen von ATP) als auch in den Thrombozyten stattfinden kann:

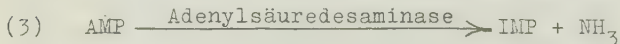


Das nun gebildete ADP kann so seine thrombozytenagglomerierende Wirkung ausüben. Das ADP unterliegt aber sofort der Umwandlung in ATP und AMP und zwar durch eine in den Thrombozyten vorhandene Adenylatkinase:



Dabei wird von der Adenylatkinase sowohl in den Thrombozyten entstandenes, als auch exogen zugeführtes ADP in den Thrombozyten erfaßt.

Das entstandene AMP wird gleich weiter abgebaut durch Adenylsäuredeaminase:



IMP = Inosin - 5' - Monophosphat

Daß die Agglomeration der Thrombozyten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und einem Plasmfaktor, der beim v. Willbrand-Jürgenssyndrom fehlen soll, abhängig ist, stellten NILSSON und Mitarbeiter (23) 1957 fest.

#### B) Versuchsanordnungen:

1. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur ( $20 - 22^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt.
2. Zählung der Thrombozyten nach Feissly-Lüdin in einer Modifikation nach MARX - DERLATH (24):

"In einer Leukozytenzählpipette (für eine Zählung der Thrombozyten beim Kaninchen verwendet man besser die Erythrozytenzählpipette) wird bis zur Marke 0,5 Citratblut aufgezogen und dann eine 2 %ige Novocainlösung bis zur Marke 11. Das Gemisch läßt man 5 Minuten bei Zimmertemperatur hämolysieren, wobei die hohe Stabilität der Thrombozyten und Leukozyten gegenüber der geringeren der Erythrozyten zur Differenzierung ausgenützt wird. Man beschickt mit der Mischung in der Pipette eine Neubauerzählkammer und läßt 5 Minuten sedimentieren; mit Objektiv PH 20 und dem Kompensationsokular 15-fach zählt man 5 mittlere Quadrate auf Thrombozyten aus. Die Summe der in den 5 Quadraten der Zählkammer gefundenen Thrombozyten multipliziert man mit 1.200, worauf man die Gesamtzahl der Thrombozyten in mm<sup>3</sup> erhält. Die Hämolysenmischung Menschenblut-Novocain kann sogar mit einem geringen Fehler (rund 5 % Abnahme) bis zu 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt werden."

Bemerkung:

- a) In meinen Versuchen wurde die Dauer der Hymolyse auf 20 Minuten angesetzt, da sich Erythrozyten mancher Individuen als osmotisch besonders resistent zeigten, so daß sie nach 5 Minuten noch nicht alle hämolysiert waren. Dadurch hätten die noch nicht hämolysierten Erythrozyten durch Verdecken von Thrombozyten das Zählergebnis verfälschen können.
- b) Da durch Einbringen der Zählkammer in eine feuchte Kammer kaum etwas von der zu untersuchenden Blutprobe verdunsten konnte, war es möglich, 20 Minuten bis zum Auszählen zu warten. Dies hatte den Vorteil, daß die Thrombozyten so gut wie vollständig absedimentiert waren, so daß man mit einer Einstellung des Objektisches alle Thrombozyten zählerisch erfassen konnte.
- c) Vor Beschicken einer (doppelten) Zählkammer wurden grundsätzlich 20 Tropfen aus der Zählpipette verworfen.
- d) Der angegebene Multiplikationsfaktor von 1.200 gilt für die Auszählung von Thrombozyten aus Citratblut, in dem sich 1/5 Natr.citr. 3,8 %ig befindet. Für 1/10 Citratblut gilt der Multiplikationsfaktor 1.100.
- e) Die Genauigkeit der verwendeten Methode wird mit  $\pm 4 \%$  angegeben (9).
- f) Vor Aufziehen des Blutes bzw. Plasmas in die Zählpipette wurde jedesmal die Probe im Reagensglas definiert mittels eines von mir zu diesem Zwecke entworfenen Apparates aufgeschüttelt:  
Siehe nachfolgende Skizze!

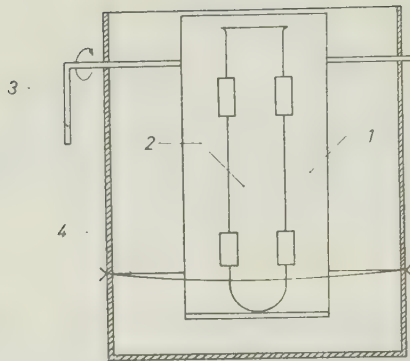


Abb. 1.

1 Reagensglashalter    2 Reagensglas  
3 Hebel    4 Gummi

Erklärung der Skizze: Siehe Abb. 1)

An der zwei gegenüberliegende Wände verbindenden Achse, deren eines Ende als Hebel [3] umgebogen ist, hängt ein Reagensglashalter [1], dessen elastische Metallklammern Reagensgläser verschiedener Länge und Durchmesser halten können. Gegen das untere Ende zu ist der Reagensglashalter zwischen die Stränge eines einfachen Packringes [4] geklemmt, der sich zwischen den Wänden in Verlaufsrichtung der Achse ausspannt. Drückt man nun den Hebel in Pfeilrichtung, so wird damit gleichzeitig der Reagensglashalter in entsprechender Richtung ausgelenkt. Läßt man den Hebel los, so schnellt der Reagensglashalter in die entgegengesetzte Richtung und vollführt eine durch den gespannten Gummi stark gedämpfte Schwingung, während der der Inhalt des Reagensglases [2] durchmischt wird.

Normung des Schüttelns geschieht dadurch, daß jedesmal bis zum Anstoßen an der Stirnwand

elongiert, die Wiederholung dieses Vorganges gezählt, gleiche Mengen Blut (innerhalb einer Versuchsreihe beim Vorliegen verschiedener Proben) und gleiche Reagensgläser verwendet werden.

### 3. Photometrische Messung

der Agglomeration in Abhängigkeit von der Zeit und des verwendeten Agglomerans:

JÜRGENS gab 1949 (25) an, daß man die Thrombozytenagglomeration dadurch photometrisch messen könnte, weil sich die Lichtabsorption von thrombozytenreichem Plasma durch die Bildung von Agglomeraten im Sinne einer Abnahme der Absorption des hindurchgeschickten Lichtes ändert.

Auch BORN wandte das Prinzip dieser Methode bei seinen in-vitro-Versuchen an (13, 22).

Bei dem von mir verwendeten Stabphotometer der Firma Lange, Berlin, handelte es sich lediglich um eine Lichtquelle, von der aus Licht durch eine 1-ml-Küvette hindurchgeschickt wurde. Das durch die Küvette dringende Licht fiel auf eine Photozelle. Dadurch entstand in dieser Strom, der über ein Potentiometer geleitet, von einem Milliampereometer, mit der Skaleneinteilung 1 - 100 gemessen wurde. Je mehr Licht durch die mit dem zu untersuchenden thrombozytenreichen Plasma gefüllte Küvette fiel, desto stärker schlug das Instrument aus; die Extinktion war also geringer. Die damit gezeitigten Ergebnisse wurden nicht quantitativ gewertet, sondern zum Zeichnen von Kurven verwendet, deren Verlauf die Geschwindigkeit der Agglomeratbildung in Abhängigkeit von der Zeit und des verwendeten Agglomerans recht eindrucksvoll zeigen. Als "Vollwert" wurde thrombozytenreiches Plasma verwendet, dem physiolog. NaCl-Lösung in der Menge zugesetzt worden war, in der nachfolgend anderen Proben etwa ADP-Lösung hinzukam. Als "Leerwert" wurde thrombozytenfreies Plasma eingesetzt und das Potentiometer so geregelt, daß der Zeiger des Instrumentes genau auf 100 zeigte. Sinngemäß mußte diese Justierung natürlich vor Einsetzen des Vollwertes erfolgen. Die Lichtabsorption wurde während eines Versuches, der immer 20 Min. lang lief, alle 30 Sek. gemessen. Innerhalb dieser 30 Sek. wurde die Probe jeweils 5 mal mit dem Schüttelapparat durchmischt. Das agglomerierende Agens kam zum Zeitpunkt 0 dazu. In entsprechenden Versuchen wurde beispielsweise Adenosin oder AMP 2 Min. vor Zugabe des Agglomerans der Probe beigemischt. Die abgelesenen Werte wurden zunächst tabellarisch erfaßt und dann als Kurve aufgezeichnet.

Eventuell durch das Mischen alleine auftretende Änderungen der Extinktion, wie sie BORN (13) beim Rühren einer Plasmaprobe mit einer Umdrehungszahl von 1000/Min. beobachtet hat, blieben in meinen Versuchen wegen der relativ schwachen Durchmischung unberücksichtigt.

#### 4. Untersuchtes Material:

- a) Citratvenenblut von Menschen
- b) Citratvenenblut von Kaninchen (durch Punktion einer Ohrvene eines vorher mit Xylol hyperämisierten Ohres gewonnen)

Die vorgelegten Mengen von Citrat sind bei den Versuchen jeweils vermerkt.

- c) thrombozytenreiches Plasma von:  $\alpha$ ) Menschen  
 $\beta$ ) Kaninchen

Aufbewahrung des Blutes bzw. des Plasmas erfolgte bei Zimmertemperatur.

#### 5. Darstellung

##### a) thrombozytenreichen Plasmas:

2 x 5 Min. bei 800 U/Min. (in einer "Christzentrifuge") wurde zentrifugiert und jeweils nach dem Zentrifugieren das überstehende Plasma vorsichtig, ohne Erythrozyten mit zu erfassen, mit einer sauberen Pipette abgesaugt. Das so gewonnene thrombozytenreiche Plasma wurde vor Versuchsbeginn und auch während eines längeren Stehens mikroskopisch auf das Vorhandensein von Agglomeraten untersucht. Zeigten sich solche, so kam das Material nicht zur Verwendung.

##### b) thrombozytenfreien Plasmas:

2 x 20 Min. bei 4.000 U/Min. wurde zentrifugiert. Nach dem erstmaligen Zentrifugieren wurde das Plasma vorsichtig abpipettiert, in ein neues Zentrifugenglas gefüllt und dieses nach erneutem Zentrifugieren von seinem Bodensatz in ein neues Glas umgefüllt. Fanden sich bei mikroskopischer Untersuchung dann immer noch Thrombozyten, so mußte noch einmal zentrifugiert werden. Meist genügte aber zweimaliges Zentrifugieren!

## 6. Das TEG:

- a) Film laufen lassen
- b) 0,3 ml Citratblut in die Küvette einpipettieren
- c) 0,06 ml  $\text{CaCl}_2$  (1,29 %ig) dazugeben
- d) Lichtschranke öffnen
- e) Mit dem Torsionstempel durch wiederholtes Hineinsenken in die Küvette durchmischen
- f) Torsionstempel in die Küvette senken und ihn darin belassen
- g) Die Oberfläche der Probe mit einigen Tropfen Paraffinöl versiegeln, um ein Austrocknen des Substrates zu verhindern.
- h) Man läßt den Versuch so lange laufen, bis sich der Ausschlag des Lichtzeigers nicht mehr vergrößert.

## 7. Thrombozytenwaschung:

Die Herstellung sog. "primär" gewaschener Thrombozyten geschieht folgendermaßen:

- a) Abnahme des Venenblutes unter Vorlegen von  $1/5$  Sequestren (1 %ig), welches besonders stark die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ausfällt und am besten suspensionsstabilisierend auf Thrombozyten wirkt.
- b) Herstellung thrombozytenreichen Plasmas wie unter 5 a) beschrieben: Allerdings wird dabei nur einmal 5 Min. bei 800 U/Min. zentrifugiert und das in einem paraffinierten Zentrifugenglas, um eventuell beim zweiten Mal des Zentrifugierens auftretende Agglomerate zu verhindern. In den nachfolgenden Schritten werden die Thrombozyten ohnehin noch genügend mechanisch "maltrahiert", wozu ihre Tendenz, zu agglomerieren, erhöht wird.
- c) 1 ml des gewonnenen thrombozytenreichen Plasmas kommt in ein großes Zentrifugenglas und außerdem dazu noch 1 ml Sequestren plus 10 ml (bzw. 50 ml) physiologische NaCl-Lösung.
- d) Dieses Gemisch wird 20 Min. lang bei 4.000 U/Min. zentrifugiert; danach kann der Überstand dekantiert werden. Die am Boden des Glases haftenden Thrombozyten sind damit zum ersten Mal primär gewaschen. Will man sie noch einmal waschen, werden sie wiederum in 1 ml Sequestren und 10 ml physiolog. NaCl-Lösung aufgenommen dadurch, daß man sie mit der Spitze eines paraffinierten Glasstabes vorsichtig aufrührt, nochmals zentrifugiert und dann den Überstand wieder abschüttet.

- e) Nach dem Waschen kann der Bodensatz unter vorsichtigem Umrühren mit dem paraffinierten Glasstab in einer geringen Menge z. B. physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen werden. Unter dem Mikroskop betrachtet, liegen die Thrombozyten nach dreimaligem Waschen meist noch einzeln.

Für meine Versuche wurden die Thrombozyten, durch Waschen weitgehendst von Plasma gereinigt, in Ringerlösung aufgenommen.

Nach einem Vorschlag von MARX (26) wird der eben beschriebene Waschvorgang als Primärwaschung im Unterschied zu der Sekundärwaschung bezeichnet. Bei dieser werden die Thrombozyten zunächst in thrombozytenreichem Plasma scharf abzentrifugiert, das überstehende Plasma verworfen und dann erst in Sequeste n und Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

### 8. Defibrinieren von Plasma:

Das Defibrinieren von Plasma geschieht dadurch, daß man es 5 Min. lang bei 58°C erhitzt und dann von den Ausfällungen scharf abzentrifugiert. Neben der Defibrinierung des Plasmas werden dabei auch die Faktoren V und VIII inaktiviert, die unter der Bezeichnung Plasmafaktor zusammengefaßt werden.

### 9. Mikroskopische Betrachtung:

Die mikroskopische Betrachtung von Agglomeraten und deren Vergleich untereinander in verschiedenen Präparaten geschah nach grob qualitativen Gesichtspunkten:

|                                         |     |
|-----------------------------------------|-----|
| Vorhandensein von Agglomeraten:         | +   |
| Vorhandensein von weniger Agglomeraten: | (+) |
| Vorhandensein sehr vieler Agglomerate:  | +++ |

Bei dieser vergleichenden Betrachtung wurde nicht nur die Menge, sondern auch die Größe der Agglomerate beachtet.

### 10. Ansatz und Aufbewahrung der Lösungen von ADP, AMP, ATP und Adenosin

- a) Die Substanzen lagen zunächst in kristallinem Zustand vor und waren von Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim, bezogen worden.

- b) Die angegebenen Konzentrationen in  $\mu$  beziehen sich immer auf  $\mu$ /ml. Wenn es z. B. heißt: 1  $\mu$  ADP/ml, so wurden zu 0,9 ml Plasma oder Blut 0,1 ml physiologische NaCl-Lösung gegeben, in denen sich 1  $\mu$  ADP befand.
- c) Diese geringen Mengen ADP, AMP, ATP und Adenosin wurden durch entsprechende Verdünnung in physiolog. Kochsalzlösung hergestellt.
- d) Die Lösungen wurden nie länger als drei Tage aufbewahrt. Während der Versuche standen sie in Eiswasser, ansonsten wurden sie in der Kühltruhe aufbewahrt.
- e) AMP, ADP, ATP lösten sich spontan in Kochsalzlösung, während Adenosin erst durch leichtes Erwärmen zum Lösen gebracht werden konnte. In Eiswasser fiel es dann, in höheren Konzentrationen gelöst, wieder aus.

C) Bestätigung des Befundes, daß ADP in vitro Menschen-thrombozyten agglomeriert

Durch Auszählung:

Jeweils wurde 1/5 Natr.citr. (3,8 %ig) vorgelegt.

Verwendung von Leukozytenzhlpipetten.

Die Proben wurden 5 Min. nach Beschickung mit ADP zur Auszählung entnommen.

| <u>Citratblut</u> |                                | <u>thrombozytenreiches<br/>Citratplasma</u> |                                |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------|
| <u>Leerwert</u>   | <u>10 <math>\mu</math> ADP</u> | <u>Leerwert</u>                             | <u>10 <math>\mu</math> ADP</u> |
| Vp. S.            | 273.000                        | 146.000                                     |                                |
| Vp. R.            | 266.400                        | 96.600                                      |                                |
| Vp. K.            | 271.800                        | 85.800                                      |                                |
| Vp. F.            |                                | 483.000                                     | 131.400                        |
| Vp. H.            |                                | 358.800                                     | 169.200                        |
| Vp. M.R.          |                                | 609.000                                     | 106.200                        |

(Vp. = Versuchsperson)

| <u>Vp. H.</u> | <u>Thrombozyten/mm<sup>3</sup> im Citratblut</u> |
|---------------|--------------------------------------------------|
| Leerwert      | 256.800                                          |
| 1% ADP        | 238.200                                          |
| 10% ADP       | 177.000                                          |

Ergebnis:

1. Durch Zugabe von ADP zu menschlichem Citratblut werden die Thrombozyten z. T. agglomeriert.
2. Bei Anwendung gleicher Dosen von ADP bei verschiedenen Individuen besteht eine unterschiedliche Tendenz der Thrombozyten, zu agglomerieren.
3. Bei Betrachtung von Blut- oder Plasmaproben fiel auf, daß der dichten Aneinanderlagerung der Thrombozyten beim Vorgang der Agglomeration eine gegenseitige Annäherung von Thrombozyten zu Gruppen vorausgeht. Ich möchte diesen Vorgang als "Annäherungsphänomen" bezeichnen. Dies konnte vor allem beobachtet werden bei Anwendung geringerer Mengen von ADP in Blut- oder Plasmaproben, deren Thrombozyten nicht so stark mit Agglomeration auf die Gabe von ADP hin reagierten.

Photometrisch: 1/10 Natr. citr.! Siehe Abb. 2 Seite 23

Ergebnis:

Aus den Kurven ist ersichtlich, daß die Thrombozyten in thrombozytenreichem menschlichem Plasma unter der Wirkung von ADP agglomerieren, - unterschiedlich schnell und stark.

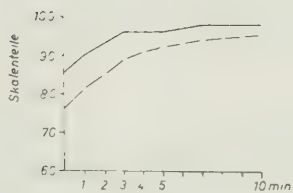


Abb 2

— Vo F 0.5g ADP — Vo W 0.5g ADP

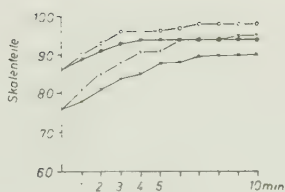


Abb 3

—○— Vo G 0.5g ADP  
 —●— Vo G 0.5g Adenosin + 0.5g ADP  
 - - - Vo W 0.5g ADP  
 — Vo W 0.5g Adenosin + 0.5g ADP

Bemerkung:

Die Kurven wurden deshalb nicht bis zur Zeit  $t = 20$  Min. weitergezeichnet, weil sie bis  $t = 20$  Min. den Wert von  $t = 10$  Min. ungefähr beibehalten haben.

Bestätigung durch TEG (= Thrombelastograph):

Das TEG wurde in der schon beschriebenen Weise mit 1/5 Citratblut bzw. -plasma angesetzt.

|       |          | <u>Citratplasma</u> |                                  | <u>Citratblut</u>   |                                  |
|-------|----------|---------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
|       |          | <u>Thrombozyten</u> | <u><math>M_{\xi}</math> (mm)</u> | <u>Thrombozyten</u> | <u><math>M_{\xi}</math> (mm)</u> |
| Vp.S. | Leerwert | 451.800             | 65                               |                     |                                  |
|       | 10% ADP  | 78.000              | 57                               |                     |                                  |
| Vp.N. | Leerwert | 483.000             | 66                               |                     |                                  |
|       | 10% ADP  | 131.400             | 57,5                             |                     |                                  |
| Vp.R. | Leerwert |                     |                                  | 282.000             | 65                               |
|       | 10% ADP  |                     |                                  | 159.000             | 48                               |

Ergebnis:

1. Wiederum zeigt es sich, daß durch Zugabe von ADP zu Citratblut oder -plasma die Zahl der einzeln liegenden Thrombozyten abnimmt.
2. Durch Zugabe von ADP nimmt auch die Maximalamplitude ( $M_{\xi}$ ) der durch den Thrombelastographen gezeichneten Kurve, verglichen mit dem Leerwert ab. Der Abfall ist aber relativ mäßig.

D) Bestätigung des Befundes, daß die durch ADP hervorgerufene Agglomeration menschlicher Thrombozyten durch Zugabe von Adenosin gehemmt werden kann

Verwendung von 1/10 thrombozytenreichem menschlichem Plasma.

Darstellung des Befundes mittels photometrischer Messung. (Siehe Abb. 3, Seite 23)

Ergebnis:

1. Daß dem Adenosin selbst kein agglomerierender Effekt auf die Thrombozyten zukommt, geht daraus hervor, daß sich der Vollwert bis zum Zugeben von ADP, nachdem das Adenosin schon 2 Min. der Probe beigemischt war, nicht geändert hat. Proben, die mit Adenosin versetzt, 20 Min. lang makroskopisch beobachtet worden sind und mikroskopische Betrachtung bestätigen dies.
2. Durch die geringere Anstiegssteilheit der Kurven, die sich ergeben, wenn Adenosin beigemischt ist, und die höhere Extinktion ist erkenntlich, daß dem Adenosin tatsächlich eine Hemmwirkung auf die Geschwindigkeit der Agglomeratbildung und deren Ausmaß zukommt.
3. In diesen Vers uchen konnte eine Beschleunigung der Auflösung der Agglomerate unter der Wirkung von Adenosin selbst in einem Zeitraum von 20 Min. nicht festgestellt werden. Auch ist aus den Kurven eine spontane Lösung der Agglomerate nicht ersichtlich. Dies mag sich jedoch aus der Art der Versuchsanordnung ergeben: Durch das Schütteln findet zwar schon eine Durchmischung der Flüssigkeit und nichtagglomerierter Thrombozyten statt (läßt sich durch einen Tuschetropfen, den man in

eine mit Wasser gefüllte Photometerküvette fallen läßt, beweisen), ab einer bestimmten Größe der Agglomerate werden diese jedoch zu Boden geschleudert und wegen des geringen Lumens der Küvette schlecht wieder aufgewirbelt. Daß eine spontane Auflösung der Agglomerate stattfindet, auf die Schütteln außerdem fördernd wirkt, läßt sich dadurch nachweisen, daß man mit der Hand schüttelt, womit auch am Boden liegende Agglomerate aufgewirbelt werden können. Mißt man dann die Extinktion, so stellt man eine Zunahme derselben fest. Da das Schütteln per Hand jedoch schlecht normbar ist, mußten die Nachteile des Schüttelapparates bei den Messungen in Kauf genommen werden. Spontane Lösung von Agglomeraten menschlicher Thrombozyten wurde in Versuchen mit 1/10 Citratblut makroskopisch mehrmals mit Dosen von nur 0,5  $\gamma$  ADP beobachtet. Die Auflösung der Agglomerate ging dabei manchmal so schnell vor sich, daß sie innerhalb von 5 Min. schon nicht mehr sichtbar waren und, entnahm man 5 Min. nach Beschickung mit ADP eine Probe zur Auszählung, lagen die Thrombozyten nachher beim Auszählen in der Zählkammer wieder fast alle einzeln.

In den Versuchen mit Kaninchenthrombozyten lassen sich diese Effekte, wie aus den folgenden Kurven ersichtlich, deutlicher darstellen.

III.

In-vitro-Versuche mit Kaninchenthrombozyten zur Untersuchung folgender Befunde:

A) Thrombozytenagglomeration durch

- a) ADP und spontane Wiederauflösung der Agglomerate
- b) ATP

B) Hemmbarkeit der durch ADP hervorgerufenen Thrombozytenagglomeration durch Adenosin und AMP

Ad A) a):

1. Rein makroskopischer Nachweis unter Verwendung von 1/10 Citratblut bzw. -plasma:

Vergleicht man zwei Reagensgläser nebeneinander, in denen sich zum einen 0,9 ml thrombozytenreiches Plasma plus 0,1 ml physiolog. Kochsalzlösung und zum anderen 0,9 ml thrombozytenreiches Plasma plus 0,5  $\mu$  ADP (in 0,1 ml Kochsalzlösung gelöst) befinden, so stellt man nach ungefähr 30 Sek. (nachdem man Kochsalzlösung bzw. ADP hinzugefügt und kurz geschüttelt hat) folgendes fest:

In dem Röhrchen ohne ADP ist die Opaleszenz unverändert vorhanden geblieben, während in dem Röhrchen mit ADP die Opaleszenz abnimmt, das Plasma lichtdurchlässiger wird und kleine Flocken entstehen, langsam absedimentierend. Mikroskopisch betrachtet, stellen sich diese Flocken als massive Thrombozytenagglomerate dar. Durch Schütteln lassen sich diese Flocken im Moment noch nicht wieder zum Verschwinden bringen.

20 Min. später: In dem Röhrchen ohne ADP ist noch unver-

ändert Opaleszenz und leichte Schlierenbildung beim Schütteln beobachtbar. (Diese Schlierenbildung in thrombozytenreichem Plasma ist makroskopisch ein recht gutes Kriterium für das vollständige oder zumindest fast vollständige Fehlen von Agglomeraten. Am Verschwinden der Schlieren konnte wiederholt festgestellt werden, daß sich Agglomerate gebildet hatten, die makroskopisch noch nicht sichtbar waren.)

In dem Röhrchen mit ADP-Zusatz erscheint das Plasma eine Spur trüber als am Anfang. Die Agglomerate sind fast vollständig absedimentiert. Durch Schütteln können diese aufgewirbelt und zu einem Teil zum Verschwinden gebracht werden, so daß die Opaleszenz des thrombozytenreichen Plasmas dieser Probe noch weiter zunimmt.

#### Ergebnis:

Durch Zusatz von ADP zu thrombozytenreichem Citratplasma eines Kaninchens entstehen Agglomerate, die sich nach einer Zeit von 20 Min. makroskopisch deutlich wahrnehmbar zum Teil wieder aufgelöst haben.

#### 2. Nachweis durch Zählung:

| <u>Kaninchen 12</u> | 1/5 Citratplasma | <u>Thrombozyten/mm<sup>3</sup></u> |
|---------------------|------------------|------------------------------------|
| Leerwert            |                  | 784.200                            |
| 5 $\mu$ ADP         |                  | 448.800 43% Abweichung             |
| <u>Kaninchen 2</u>  | 1/10 Citratblut  | <u>Thrombozyten/mm<sup>3</sup></u> |
| Leerwert            |                  | 542.400                            |
| 0,5 $\mu$ ADP       |                  | 204.000 62% Abweichung             |

Ergebnis:

1. Auch hier findet sich wieder starke Abnahme der einzelliegenden Thrombozyten nach Zugabe von ADP.
2. Die Abnahme der einzelliegenden Thrombozyten durch Zugabe von ADP erweist sich bei Kaninchen Nr. 2 um 62 % gegenüber Kaninchen Nr. 12 um nur 43 % als stärker. Dies ist um so auffälliger, da bei Kaninchen Nr. 2 nur 1/10 der bei Kaninchen Nr. 12 angewendeten ADP-Dosis dem Citratblut zugesetzt worden ist. Selbst wenn man einräumt, daß zu einem auch hier individuelle Empfindlichkeit der Thrombozyten gegenüber ADP vorliegt und zum anderen sich die Tendenz der Thrombozyten, zu agglomerieren, durch die Manipulationen zur Darstellung des thrombozytenreichen Plasmas erhöht haben kann, scheint hier aber auch ein Hinweis auf eine Abhängigkeit der Agglomerations-tendenz der Thrombozyten von der Konzentration freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vorzuliegen (SPAET und ZUCKER (27)). Im Gesamtvolumen des bei Kaninchen 2 abgenommenen Blutes besteht 1/10 aus Natr.citr. (3,8 %ig), beim Kaninchen 12 1/5!

Daß sich die durch ADP hervorgerufenen Agglomerate spontan wieder lösen, zeigen auch folgende Zählergebnisse:

| <u>Kaninchen 25</u>     | 1/10 Citrat | <u>Thrombozyten/mm<sup>3</sup></u> |
|-------------------------|-------------|------------------------------------|
| Leerwert                |             | 682.000                            |
| 5 Min. nach ADP-Zugabe  |             | 165.000                            |
| (0,5%)                  |             |                                    |
| 10 Min. nach ADP-Zugabe |             | 266.000                            |

### 3. Photometrischer Nachweis:

Verwendung von 1/10 Natr. citr., siehe Abb. 4, Seite 31

#### Ergebnis:

Kurve mit 0,5% ADP zeigt, daß Kaninchenthrombozyten unter der Wirkung von ADP agglomerieren. Aus dieser Kurve ist außerdem ersichtlich, daß sich die Agglomerate zum Teil wieder gelöst haben.

#### Ad A) b):

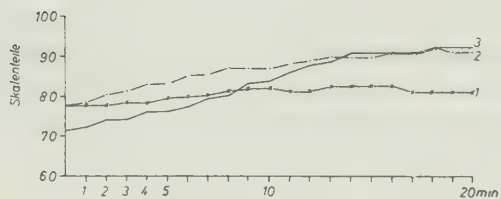
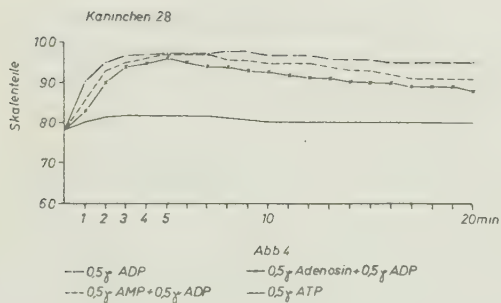
Bei Verwendung von ATP in einer Dosis von 0,5% /ml thrombozytenreichen Plasmas lassen sich kaum makroskopisch Agglomerate erkennen. Daß sich aber Agglomerate bilden, verrät das Schwächerwerden oder gar völlige Verschwinden der schon erwähnten, beim Schütteln der Probe, entstehenden Schlieren. Mikroskopisch sind die Agglomerate jedoch nachweisbar. Obige Abb. 4 zeigt die Wirkung einer Dosis von 0,5% ATP/ml. Eine gewisse Auflösung der Agglomerate ist auch erkennbar.

#### Ad B):

Beschickt man drei Reagensgläser, in denen sich je 0,8 ml thrombozytenreiches Plasma befinden folgendermaßen:

- I. 0,8 ml Plasma + 0,2 ml NaCl-L.
- II. 0,8 ml Plasma + 0,1 ml NaCl-L + 0,5% ADP (0,1 ml)
- III. 0,8 ml Plasma + 0,5% Adenosin (0,1 ml) + 0,5% ADP (0,1 ml)

wobei zunächst in Nr. I und II die physiolog. Kochsalzlösung dann in III das Adenosin und 2 Min. von diesem Zeitpunkt aus gerechnet, quasi gleichzeitig in II und III das



ADP einpipettiert wird, schüttelt die bezeichneten Gläschen alle in einer Hand kurz durch und stellt sie gegen das Licht, so kann man beobachten:

1. Der Inhalt der drei Gläser weist zunächst gleiche Opaleszenz auf.
2. Nach ungefähr 40 - 50 Sek. treten in II und mit kurzer zeitlicher Verzögerung von einigen Sekunden auch in III Agglomerate auf.
3. Die Stärke der Agglomeration ist in II und III deutlich unterscheidbar, da sie in II stärkere Klärung des Plasmas als in III hervorruft.
4. Die Zunahme der Trübung, nach etwa 6 - 9 Min. wahrnehmbar, beginnt zuerst in Glas III, während dieser Vorgang in Glas II zeitlich nachhinkt.
5. Nach etwa 20 - 25 Min. lassen sich die noch vorhandenen Agglomerate in II und III durch kurzes Schütteln so weit zum Verschwinden bringen, daß sich die Gläser II und III in ihrer Trübung kaum noch untereinander unterscheiden, und außerdem fast dieselbe Opaleszenz wie Glas I aufweisen. Jedoch können in II und III durch Schütteln keine Schlieren mehr erzeugt werden.

#### Ergebnis:

1. Schon aus diesem einfachen Versuch geht hervor, daß durch Zugabe von Adenosin die Bildung von Agglomeraten gehemmt und ihre Auflösung gefördert wird. Bemerkenswert ist dabei, daß Adenosin gewichtmäßig in gleicher Menge wie ADP angewendet wurde.

2. Betrachtet man obige Kurven  $0,5 \mu\text{ADP}$  und  $0,5 \mu\text{Adenosin} + 0,5 \mu\text{ADP}$  (Abb. 4, S. 31), so geht aus der unterschiedlichen Anstiegssteilheit, der unterschiedlichen Höhe und deren verschieden schnellem Absinken auch hervor, daß

- a) Adenosin die Agglomeration hemmt,
- b) beim Vorhandensein von Adenosin sich die Agglomerate langsamer bilden,
- c) das Ausmaß der Agglomeration mit Adenosin geringer ist, als bei alleiniger Anwendung von ADP,
- d) die Wiederauflösung der Agglomerate gefördert wird.

3. Durch Vergleich der Kurve  $0,5 \mu\text{Adenosin} + 0,5 \mu\text{ADP}$  mit Kurve  $0,5 \mu\text{AMP} + 0,5 \mu\text{ADP}$  ergibt sich, daß AMP eben-  
dieselben Wirkungen besitzt wie sie schon bei Adenosin beschrieben sind, bei Anwendung gleicher Dosen AMP wie Adenosin ist die Wirkung von ersterem jedoch etwas schwächer als bei letzterem.

Obige Kurven sind als Repräsentanten aus einer Versuchsserie anzusehen, innerhalb derer die Befunde, die sich durch Aufzeichnen der Kurven ergeben, qualitativ untereinander decken.

IV.

Die Abhängigkeit der Thrombozytenagglomeration  
von der Konzentration der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Plasma-  
faktoren bei Verwendung von ADP als Agglomerans

A) Vorversuch:

Es ist bekannt, daß durch Verwendung gleicher Mengen von Sequestren (1 %ig) und Natr.citr. (3,8 %ig) bei der Blutabnahme durch das Sequestren mehr  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gebunden werden als durch das Natriumcitrat.

Nimmt man zwei Blutproben von ein und demselben Individuum ab, indem man einmal 1/5 des Spritzenvolumens mit Sequestren (1 %ig) und einmal 1/10 des Spritzenvolumens mit Natr.citr. (3,8 %ig) füllt, so wird in den Blutproben durch die Inhibitoren unterschiedlich viel  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden. Stellt man sich von den Proben thrombozytenreiches Plasma dar und gibt zu gleichen Mengen Sequestren- und Citratplasma gleiche Mengen ADP, so kann man makroskopisch folgendes finden:

Die auftretende Agglomeration ist in den beiden Proben sehr unterschiedlich insofern, als man im Sequestrenplasma makroskopisch nichts feststellen kann, während im Citratplasma massive Agglomerate ausfallen. Mikroskopisch betrachtet, erscheinen im Sequestrenplasma die Agglomerate sehr spärlich.

Dieser Befund läßt sich sowohl mit menschlichen Thrombozyten als auch mit denen von Kaninchen erheben.

B) Versuche mit gewaschenen Thrombozyten:

- a) Durch die Primärwaschung nach MARX werden die Thrombozyten, wie gesagt, durch reichliche Verdünnung des Plasmas vom Plasma praktisch vollständig befreit. Nun besteht

die Möglichkeit, den Thrombozyten jene Faktoren zuzuführen, von denen man annimmt, daß sie zur Thrombozytenagglomeration nötig sind.

- b) Durch Suspension der Thrombozyten mit Ringerlösung werden die Blutplättchen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in einer Konzentration von  $210 \text{ mVal} = 2,3 \text{ mg/l}$  umgeben, die der im Blute ungefähr gleichkommt.
- c) Nachdem die Thrombozytenagglomeration unter der Wirkung von ADP bei Vorhandensein von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und völligem Fehlen von Plasma untersucht worden ist, wird thrombozytenfreies Citratplasma desselben Individuums vollständig oder unter Fehlen des ihm eigenen Fibrinogens und einiger Plasmafaktoren (V und VIII) in verschiedenen Konzentrationen zu den in Ringerlösung aufgeschwemmten Thrombozyten gegeben.
- Tabellen s. u. und Seite 36!

# 1. Beispiel

|                  | 1 x<br>primär gewaschene<br>Thrombozyten |           | 3 x<br>primär gewaschene Thrombozyten |           |                          |           |
|------------------|------------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
|                  | nur in Ringerlösung auf-<br>genommen     |           | Citratplasma                          |           |                          |           |
|                  |                                          |           | 20 %                                  | 50 %      | 50 % defi-<br>briniertes |           |
| NaCl             | (+)                                      | Ø         | Ø                                     | Ø         | Ø                        | Ø         |
| 0,05% ADP Ansatz | (+)                                      | Ø         | Ø                                     | Ø bis (+) | Ø bis (+)                | Ø         |
| 0,5 % " "        | (+)                                      | Ø bis (+) | Ø                                     | Ø bis (+) | Ø bis (+)                | Ø         |
| 1 % " "          | (+)                                      | Ø bis (+) | Ø                                     | Ø bis (+) | Ø bis (+)                | Ø         |
| 2 % " "          | (+)                                      | Ø bis (+) | Ø                                     | Ø bis (+) | (+)                      | Ø         |
| 100 % " "        | (+) bis +                                | (+) bis + | Ø                                     | (+)       | (+)                      | Ø         |
| 100 % " "        | (+) bis +                                | +         | Ø                                     | (+)       | (+) bis +                | Ø bis (+) |

## 2. Beispiel

### 3 x primär gewaschene Thrombozyten

|                | nur Ringer-<br>lösung | 20 % Citrat-<br>plasma | 50 % Citrat-<br>plasma<br>normal      defibriniert |   |
|----------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------------------------|---|
| +0,1ml NaCl/ml | Ø                     | Ø                      | Ø                                                  | Ø |
| 0,05 µ ADP /ml | Ø                     | (+)                    | (+)                                                | Ø |
| 0,5 µ "        | Ø                     | (+)                    | (+)                                                | Ø |
| 5,0 µ "        | Ø                     | (+)                    | (+)                                                | Ø |
| 50 µ "         | Ø                     | (+) bis +              | +                                                  | Ø |
| 100 µ "        | Ø                     | +                      | +                                                  | Ø |
| 500 µ "        | Ø                     | +                      | +                                                  | Ø |

### Ergebnis:

1. Aus dem Vorversuch ist eine Abhängigkeit der Thrombozytenagglomeration von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration leicht ersichtlich.
2. Das alleinige Vorhandensein von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in dem die Thrombozyten umgebenden Milieu reicht noch nicht aus, die Thrombozyten zur Agglomeration durch Zugabe von ADP zu veranlassen.
3. Wie aus dem Beispiel 1 hervorgeht, nimmt das Ausmaß der Thrombozytenagglomeration mit der Anzahl der Waschungen, der sie unterzogen werden, ab. Dies ist vielleicht dadurch erklärlich, daß nach dem erstmaligen Waschen noch Spuren von Plasma vorhanden sind, die neben den freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die Agglomeration der Thrombozyten bei Hinzufügen von ADP begünstigen, während nach dreimaligem Waschen auch diese Plasmaspuren beseitigt sein dürften.

4. Daß dem Plasma, bzw. bestimmten Bestandteilen desselben agglomerationsbedingende Eigenschaften zukommen, ließ sich zeigen:

- a) Besteht das Thrombozyten-Suspensionsmittel zu 20 % aus Citratplasma und zu 80 % aus Ringerlösung, so erhöht sich die Agglomerationstendenz der Thrombozyten, wenn man ADP dazugibt. Bei Verwendung von 50 % Citratplasma tritt dieser Effekt noch klarer zutage.
- b) Defibriniert man dieses Plasma, kommt dem "Citratplasma" (1/10 Natr.citr. 3,8 %ig), in derselben Konzentration verwendet wie eben, keine agglomerationsfördernde Wirkung mehr zu. - Dabei konnte jedoch leider nicht genau geklärt werden, welche Plasmafaktoren nun genau zur Agglomeration der Thrombozyten nötig sind: Faktor I, V oder VIII, das Zusammenspiel der Faktoren untereinander, ein spezieller "Cofaktor der Thrombozytenagglomeration" eventuell zusammen mit Fibrinogen. Versuche, die analog zu den oben geschriebenen mit Blut von Patienten mit v.Willebrand-Jürgens-Syndrom durchgeführt wurden, vermochten in dieser noch offenstehenden Frage keine eindeutige Klärung zu erbringen.

#### Zusammenfassung:

Die Befunde der eingangs erwähnten Autoren ließen sich in folgender Weise bestätigen:

1. ADP wirkt in vitro auf Menschen- und Kaninchenthrombozyten agglomerierend.
2. Die durch ADP in vitro hervorgerufenen Thrombozytenagglomerate lösen sich spontan im Plasma wieder.
3. Die Agglomeration kann in der Geschwindigkeit ihres Auftretens und in ihrem Ausmaß sowohl durch Adenosin als auch

durch AMP gehemmt und die Auflösung der Agglomerate durch diese beiden Stoffe beschleunigt werden. Dabei wirkt AMP etwas schwächer als Adenosin.

4. Die Agglomeration menschlicher Thrombozyten ist von der Konzentration freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und von Plasmafaktoren abhängig. Bei Kanincenthrombozyten wurde auch eine Abhängigkeit der Thrombozytenagglomerationstendenz von der Konzentration an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beobachtet.

#### V.

Untersuchungen über die Beeinflussung der Thrombozytenagglomeration durch Heparine und Heparinoide mit kaninchen- und Menschenthrombozyten in vitro

#### Verwendete Präparate:

1. Eleparon (Luitpoldwerke)
2. Heparinoid - Geigy
3. Heparin - Novo
4. SP 54 (Dr. Bene-Chemie)
5. Heparin - Choay
6. Thrombozit (Dr. Bene-Chemie)

#### Fragestellung:

Die Bildung eines Plättchenthrombus an verletzten Gefäßwänden spielt für den Wundverschluß und für die Bildung von Thromben eine große Rolle, wie die jüngsten Untersuchungen von O'BRIEN (28) u. a. zeigen.

HOVIG (29) konnte zeigen, daß durch den Kontakt von Thrombozyten an Kollagenfasern ADP aus den Plättchen frei wird,

welches sie zur Agglomeration veranlaßt.

Heparinoid-Geigy wird therapeutisch zur Thromboseprophylaxe in Konzentrationen von 10 mg/kg Körpergewicht angewendet. Es bestand die Frage, ob es, da gerinnungshemmend, die agglomerationsfördernde Wirkung von ADP zu hemmen vermag und in wie weit speziesspezifische Effekte auftreten.

#### A) Versuchsbedingungen und Methodik:

- a) Zimmertemperatur 20 - 22°C
- b) 1/10, 1/5 Natr. citr. (3,8 %ig) oder Sequestren (1 %ig)
- c) Verwendung von thrombozytenreichem Plasma, in dem sich keine Agglomerate befanden
- d) Entnahme des Blutes beim Kaninchen aus der Ohrvene
- e) Die Auszählung der Thrombozyten geschah nach der schon bei den Versuchen mit ADP beschriebenen Methode nach Feissly-Lüdin in der Modifikation nach MARX-DERLATH (24). Da die Versuche vor allem mit thrombozytenreichem Plasma durchgeführt wurden, war eine Hämolyse mit Novocain nicht mehr nötig. In einem Mischungsverhältnis von ungefähr 1 : 10 zwischen Heparinoid-Geigy und Novocain kommt es zu Ausfällungen, die die Auszählung der Thrombozyten erschweren, ja unter Umständen die Zählergebnisse in Frage stellen können.

#### Möglichkeiten, diese Schwierigkeiten zu umgehen:

1. Aufziehen des Plasmas anstatt mit Novocain mit physiolog. Kochsalzlösung. Bei Verwendung von menschlichen Thrombozyten unterliegen diese in den Zählkammern dann einer relativ raschen Ausbreitung. Die so ausgebreiteten Thrombozyten sind für den Ungeübten aber auch nicht ganz leicht auszuzählen. Die Methode eignet sich für Kaninchenthrombozyten entschieden besser, da sie so gut wie keiner Ausbreitung unterliegen.
2. Verwendung von 1,8 %iger oder 5,0 %iger Kochsalzlösung anstelle von Novocain bei menschlichen Thrombozyten:  
Mit 1,8 %iger NaCl-Lösung zeigte sich nach 20 Minuten allmählich Pseudopodienbildung und geringfügige Tendenz der Thrombozyten zur Ausbreitung.  
Bei Verwendung von 5 %iger NaCl-Lösung wurden einige interessante Erscheinungen beobachtet:

- a) 10 Min. nach Beschickung der Zählkammer stellten sich die sonst durchwegs rund erscheinenden menschlichen Thrombozyten als kleine, unregelmäßig begrenzte Körperchen dar, die durch ihre atypische Gestalt schwer von kleinen Schmutzpartikelchen zu unterscheiden waren.
- b) 20 Min. nach Beschickung der Zählkammer nahmen die Plättchen wieder rundliche Formen an, - erschienen sogar etwas gebläht.
- c) 45 Min. nach Beschickung der Zählkammer würde man sehr wahrscheinlich die Thrombozyten z. T. nicht mehr als solche angesprochen haben, hätte man nicht genau gewußt, daß es sich um solche handelte: Der nach 20 Min. schon angedeutet geblähte Gestaltscharakter war nun ausgeprägt wahrnehmbar. Auf das 2 - 4fache ihres ursprünglichen Volumens ballonartig gebläht, stellten sich nun die Thrombozyten dar. Meist fand sich randständig ein sich in heftiger Bewegung befindendes kernartiges Gebilde, das den Eindruck machte, als wollte es mit seinen Bewegungen die Membran des Thrombozyten durchstoßen, dem Inneren zu fliehen. Bis zu 60 Min. lang wurden diese Vorgänge in Zählkammern beobachtet, deren Deckglas mit einem Öltropfen seitlich als Austrocknungsschutz versiegelt war. Ein Platzen der Thrombozyten konnte nicht beobachtet werden. Zählergebnisse lassen dies auch als unwahrscheinlich erkennen:

Auszählung derselben Kammer:

|                           |                                      |
|---------------------------|--------------------------------------|
| nach 10 Min. Verweildauer |                                      |
| i.d.feuchten Kammer       | 127.800 Thrombozyten/mm <sup>3</sup> |
| nach 45 Min. Verweildauer |                                      |
| i.d.feuchten Kammer       | 124.200 Thrombozyten/mm <sup>3</sup> |

Auch geht hieraus hervor, daß eine durch den Gestaltwechsel der Thrombozyten immerhin mögliche Verwechslung der Thrombozyten mit Retikulozyten nicht stattgefunden hat.

3. Ersatz des sonst verwendeten Novocains durch Veronalpuffer ph 7,6, mit Heparinoid-Geigy in verschiedenen Verhältnissen gemischt, zeitigt keine störenden Ausfällungen. Unter dem Einfluß von Veronalpuffer lassen die Thrombozyten schon nach 10 Min. jene bei Verwendung von 5 %iger NaCl-Lösung beschriebenen Bläheeffekte erkennen, jedoch nicht so stark. Erst nach 1 1/2 Stunden erschienen Pseudopodien. Um auf alle Fälle Verluste von Thrombozyten durch Platzen weitgehendst

auszuschließen, (was zwar nicht beobachtet wurde, aber immerhin doch denkbar wäre, da die Membran der Thrombozyten durch das Schrumpfen und das anschließende Blähen wahrscheinlich geschädigt ist), empfiehlt es sich, mit der Zählung nicht länger als 20 Min. zu warten.

| <u>Beispiel:</u> | <u>15 Min.i.d.feucht.Kammer</u> | <u>20 Min.i.d.feucht.Kammer</u> |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Veronalpuffer    | 212.900                         | 256.600                         |
| Novocain         | 220.000                         | 265.600                         |

Die Zahlenwerte wurden aus vier verschiedenen Kammern ermittelt.

#### Ergebnis und Zusammenfassung:

Befindet sich in einer Plasmaprobe, deren Thrombozyten gezählt werden sollen, etwas Heparinoid-Geigy, so entstehen beim Aufziehen eines Teiles dieser Plasmaprobe in eine Zählpipette mit Novocain Ausfällungen, die dadurch verhindert werden können, daß man anstatt des Novocains folgende andere Verdünnungsmittel verwendet:

- a) Physiolog. Kochsalzlösung
- b) Hypertone Kochsalzlösung
- c) Veronalpuffer ph 7,6

- 
- f) Die angegebenen mg% von Heparinoid-Geigy besagen, daß 0,9 ml thrombozytenreichem Plasma soviel Heparinoid-Geigy, in 0,1 ml physiolog. NaCl-Lösung gelöst, zugegeben worden ist, damit die angegebenen mg% erreicht sind.
  - g) Bei Zugabe von ADP und Heparinoid-Geigy zu ein und derselben Plasmaprobe wurde darauf geachtet, daß immer zuerst Heparinoid-Geigy beigemischt wurde, damit es, falls überhaupt möglich, den agglomerationsfördernden Effekt von ADP von vornherein hemmen könnte.

#### B) In-vitro-Versuche mit thrombozytenreichem Menschenplasma unter Verwendung von Heparinoid-Geigy und ADP

Von verschiedenen Personen wurde Citratblut abgenommen (1/5 Citrat) und davon thrombozytenreiches Plasma in der schon beschriebenen Weise gewonnen. Aus jeder Zählpipette (Leukozyten) wurden zwei Zählkammern zur Bestimmung von Parallelwerten beschickt.

Die angegebenen Mengen von ADP in  $\mu$  bedeuten, daß zu 0,9 ml Plasma soviel  $\mu$ ADP, in physiolog. Kochsalzlösung gelöst, hinzugefügt worden sind, daß die Endkonzentration in dem entstandenen 1,0 ml soviel  $\mu$ ADP beträgt.

Also  $\mu$ /ml!

Siehe folgende Tabelle u. Seite 43!

| Vp. R.                 | 1.Kammer | %<br>Unter-<br>schied | 2.Kammer | Mittel-<br>wert<br>(M) | %<br>Unterschied<br>zu M-Leer-<br>wert |
|------------------------|----------|-----------------------|----------|------------------------|----------------------------------------|
| Leerwert               | 200.800  | 7 %                   | 216.600  | 208.700                | 0 %                                    |
| 1 $\mu$ ADP            | 125.400  | 4,5%                  | 131.400  | 128.400                | 38,5 %                                 |
| 10 mg% H.G.            | 204.600  | 8 %                   | 188.400  | 196.500                | 5,5 %                                  |
| 20 mg% H.G.            | 179.600  | 4,5%                  | 171.000  | 175.300                | 17 %                                   |
| 1 $\mu$ ADP+10mg% H.G. | 82.800   | 0 %                   | 82.800   | 82.800                 | 60 %                                   |
| 1 $\mu$ ADP+20mg% H.G. | 61.800   | 8,5%                  | 56.400   | 59.100                 | 68 %                                   |

H. G. = Heparinoid-Geigy

Citratblut

| Vp. K.                 | 1.Kammer | 2.Kammer | %<br>Unter-<br>schied | Mittel-<br>wert<br>(M) | %<br>Unterschied<br>zu M-Leer-<br>wert |
|------------------------|----------|----------|-----------------------|------------------------|----------------------------------------|
| Leerwert               | 332.400  | 271.200  | 18,5%                 | 301.800                | 0 %                                    |
| 1 $\mu$ ADP            | 102.600  | 106.800  | 3,5%                  | 104.700                | 65 %                                   |
| 10 mg% H.G.            | 204.000  |          |                       |                        | 32 %                                   |
| 20 mg% H.G.            | 197.400  |          |                       |                        | 35 %                                   |
| 1 $\mu$ ADP+10mg% H.G. | 73.800   | 59.400   | 19,5 %                | 66.600                 | 78 %                                   |
| 1 $\mu$ ADP+20mg% H.G. | 58.200   | 56.500   | 3 %                   | 57.350                 | 81 %                                   |

Citratplasma

| Vp. N.                 | 1.Kammer | 2.Kammer | %<br>Unter-<br>schied | Mittel-<br>wert<br>(M) | %<br>Unterschied<br>zu M-Leer-<br>wert |
|------------------------|----------|----------|-----------------------|------------------------|----------------------------------------|
| Leerwert               | 504.400  | 522.800  | 4 %                   | 513.800                | 0 %                                    |
| 1 $\mu$ ADP            | 216.000  | 223.800  | 4,5%                  | 219.900                | 57 %                                   |
| 10 mg% H.G.            | 353.400  | 365.400  | 3 %                   | 359.400                | 30 %                                   |
| 20 mg% H.G.            | 324.600  | 321.100  | 0,5%                  | 322.800                | 37 %                                   |
| 1 $\mu$ ADP+10mg% H.G. | 138.600  | 162.000  | 14,5%                 | 152.000                | 70 %                                   |
| 1 $\mu$ ADP+20mg% H.G. | 114.000  | 95.400   | 16,5%                 | 104.700                | 79 %                                   |

H. G. = Heparinoid-Geigy

Ergebnisse zu den obigen 3. Tabellen:

1. Heparinoid-Geigy wirkt auf menschliche Thrombozyten  
i n v i t r o agglomerationsbegünstigend.
2. Trotzdem, daß die Parallelwertemanchmal Unterschiede zeigen,  
die weit außerhalb der Zählgenauigkeit liegen, geht doch  
aus den Versuchen hervor, daß
  - a) sowohl durch Heparinoid-Geigy als auch ADP die Zahl  
der einzeln liegenden Thrombozyten abnimmt,
  - b) die Thrombozytenzahl bei alleiniger Zugabe von ADP  
höher liegt als bei zusätzlicher Beimengung von Hepari-  
noid-Geigy,
  - c) die agglomerationsfördernden Wirkungen von ADP und He-  
parinoid-Geigy nebeneinander auftreten können.

Um jeden Zweifel zu entkräften, daß es sich bei der He-  
parinoid-Geigy-Wirkung im Plasma um irgendwelche durch dieses  
Pharmakon hervorgerufene Trübungserscheinungen handeln könn-  
te, wurde thrombozytenfreiem Plasma Heparinoid-Geigy in  
den üblichen Dosen zugeführt. Dabei konnten weder makros-  
kopisch noch mikroskopisch Ausfällungen beobachtet werden.

C) Untersuchungen der agglomerationsfördernden Wirkung von  
Heparinoid-Geigy in Abhängigkeit von der Konzentration  
der im Blute vorhandenen  $Ca^{2+}$ -Ionen mit Menschenthrombozyten

Von einigen Personen wurde Blut entnommen:

jeweils 1 x mit 1/5 Sequestren (1 %ig)  
1/10 Sequestren (1 %ig)  
1/10 Natr. citr. (3,8 %ig)

Direkt nach Entnahme des Blutes wurde der Leerwert bestimmt:  
0,9 ml Blut + 0,1 ml NaCl-Lösung, 5 Min. stehengelassen,  
dann zur Auszählung aufgezogen.

Ebenso wurden 0,9 ml Blut mit 0,1 mg Heparinoid-Geigy (in 0,1 ml NaCl-Lösung) miteinander gemischt, 5 Min. stehengelassen und dann zur Auszählung aufgezogen.

Bemerkung: (siehe auch untenstehende entsprechende Tabelle!)  
Das Blut der Vp.F. ist 2 Stunden bei Zimmertemperatur ge-<sup>u.S.46)</sup> standen. Dabei sind die Erythrozyten und Leukozyten soweit absedimentiert, daß das thrombozytenreiche überstehende Plasma abpipettiert werden konnte. Es zeigte sich, daß die Agglomerationstendenz der Thrombozyten unter der Wirkung von Heparinoid-Geigy nach zweistündigem Stehen gestiegen war.

| Vp. H.<br>=====     | <u>Thrombozyten</u> |                    | <u>Unterschied</u><br>% |
|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|
|                     | <u>Leerwert</u>     | <u>0,1 mg H.G.</u> |                         |
| 1/5 Sequestrenblut  | 145.750             | 125.750            | 13,5 %                  |
| 1/10 Sequestrenblut | 161.700             | 138.550            | 15 %                    |
| 1/10 Citratblut     | 135.300             | 102.650            | 25 %                    |

| Vp. R.<br>=====     |         |         |      |
|---------------------|---------|---------|------|
| 1/5 Sequestrenblut  | 220.550 | 181.500 | 18 % |
| 1/10 Sequestrenblut | 257.950 | 189.200 | 26 % |
| 1/10 Citratblut     | 293.150 | 167.200 | 43 % |

H. G. = Heparinoid-Geigy

| Vp. F.<br>=====     | <u>Thrombozyten</u> |                     | <u>%</u><br><u>Unterschied</u> |
|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|
|                     | <u>Leerwert</u>     | <u>0,1 mg H. G.</u> |                                |
| 1/5 Sequestrenblut  | 321.400             | 327.250             | keine Abnahme                  |
| 1/10 Sequestrenblut | 308.650             | 287.650             | 7 %                            |
| 1/10 Citratblut     | 285.500             | 266.750             | 7 %                            |

| Vp. F.<br>=====       |         |         |               |
|-----------------------|---------|---------|---------------|
| 1/5 Sequestrenplasma  | 482.350 | 483.450 | keine Abnahme |
| 1/10 Sequestrenplasma | 687.500 | 549.950 | 20 %          |
| 1/10 Citratplasma     | 567.450 | 338.800 | 40 %          |

H. G. = Heparinoid-Geigy

Ergebnisse zu den obenstehenden 4 Tabellen:

1. Die Agglomeration menschlicher Thrombozyten unter der Wirkung von Heparinoid-Geigy ist von der im Plasma vorhandenen Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abhängig.
2. Die Agglomeration der Thrombozyten unter der Wirkung von Heparinoid-Geigy ist hier individuell unterschiedlich.

D) In-vitro-Versuche mit thrombozytenreichem Kaninchenplasma unter Verwendung von Heparinoid-Geigy und ADF

Verschiedenen Tieren wurde durch Venenpunktion Blut entnommen unter Vorlegen jeweils einer bestimmten Menge an Sequestren oder Natr.citr. Die vorgelegten Mengen sind bei den Versuchen vermerkt.

Nach der schon beschriebenen Methode der Darstellung wurden 0,9 ml thrombozytenreichem Plasma (1/5 Citrat) 100 mg Heparinoid-Geigy (in 0,1 ml NaCl gelöst) zugeben und das Reagensglas kurz mit der Hand geschüttelt.

Nach kurzer Zeit, zwischen 30 - 90 Sek., verschwand die homogene Trübung des weißlich opaleszierenden thrombozytenreichen Plasmas dadurch, daß makroskopisch gut sichtbare Thrombozytenagglomerate ausfielen, die z. T. an der Gefäßwand hafteten, ansonsten innerhalb (je nach Größe) von 5 - 10 Min. absedimentierten und am Boden noch zusätzlich miteinander verklumpten. Damit ist der Beweis erbracht, daß Heparinoid-Geigy auf Kaninchenthrombozyten deutlich agglomerierend wirkt. Wie schon mit menschlichen Thrombozyten festgestellt, unterliegen diese Erscheinungen Schwankungen verschiedenen Ursprungs:

- a) Vorausgesetzt, vor Zugabe von Heparinoid-Geigy befanden sich im Plasma noch keine Agglomerate, scheinen doch die Thrombozyten verschiedener Versuchstiere der gleichen Spezies in Bezug auf ihre Agglomerationstendenz unter der Wirkung von Heparinoid-Geigy individuell unterschiedlich schnell zu reagieren. Schüttelt man verschiedene Plasmaproben nach Zugabe von Heparinoid-Geigy mit gleichbleibender Stärke, so treten makroskopisch sichtbar (auch bei konstant gehaltener Dosis) die Agglomerate zu verschiedenen Zeiten, vom Zeitpunkt der Zugabe von Heparinoid-Geigy aus gerechnet, auf.
- b) Die Zeit, die bis zum Auftreten der Agglomerate unter der Wirkung von Heparinoid-Geigy verstreicht, ist von der Heftigkeit des Schüttelns der Probe abhängig. Läßt man in ein Reagensglas mit thrombozytenreichem Plasma Heparinoid-Geigy lediglich aus der Pipette einfließen, und schüttelt nicht, treten die Agglomerate zwar auch

auf, jedoch relativ langsam (1 - 3 Min.).

Schüttelt man jedoch sofort nach Zugabe von Heparinoid-Geigy heftig durch, so sind die Agglomerate schon nach ca. 20 - 30" sichtbar. Durch das Schütteln findet eine schnelle Durchmischung des Plasmas mit Heparinoid-Geigy statt; den Thrombozyten wird dadurch, daß sie umhergewirbelt werden, mehr Gelegenheit gegeben, sich gegenseitig zu berühren und aneinanderhaftend Agglomerate zu bilden.

- c) Es ist oft nicht gleichgültig, ob man ein thrombozytenreiches Plasma direkt nach seiner Bereitung dem Einfluß von Heparinoid-Geigy unterwirft, oder es einige Stunden bei Zimmertemperatur stehen läßt. Bei konstant gehaltener Durchmischung und Dosis von Heparinoid-Geigy agglomerieren die Thrombozyten nach längerem Stehen schneller. Das kann sich so zeigen, daß direkt nach Bereitung des thrombozytenreichen Plasmas 1 Min. verstreicht, bis sich Agglomerate unter der Wirkung von Heparinoid-Geigy bilden. Nach zweistündigem Stehen kann es jedoch so sein, daß sich die Agglomerate nach Zugabe von Heparinoid-Geigy so schnell bilden, daß oft ein Schütteln der Probe überflüssig ist. Untersucht man dabei den Leerwert des Plasmas, so stellt man meistens, aber nicht immer!, schon darin kleine Agglomerate in Form von 2er, 3er bis zu 9er Paketen fest. Nicht immer! besagt, daß auch Plasmen gefunden wurden, die nach zweistündigem Stehen zwar noch keine Agglomerate zeigten, deren Thrombozyten (wahrscheinlich durch das Stehen) gegenüber Heparinoid-Geigy aber empfindlicher geworden waren. Diese Erscheinung möchte ich nach einem Vorschlag von MARX als "Alterungsagglomeration" bezeichnen, wobei zunächst keine genauen Gründe für diese Alterung angegeben werden können. Offensichtlich spielt aber das veränderte Milieu, in dem sich die Thrombozyten seit ihrer Entnahme aus dem Tier befinden, eine

Rolle (Lichteinwirkung, veränderte Temperatur des sie umgebenden Mediums, Kontakt mit anderen Oberflächen als denen der Blutgefäße usw.). Oft genügt schon das einfache Eintauchen einer mit physiolog. Kochsalzlösung benetzten, ansonsten aber sauberen Pipette in das thrombozytenreiche Plasma, welches einige Zeit stand, um darin spontan makroskopisch sichtbare Agglomerate entstehen zu lassen. Zu Messungen verwendetes thrombozytenreiches Plasma kam nur dann in Gebrauch, wenn es keine Spontanglomerate zeigte, also Agglomerate, die ohne weiteres absichtliches Dazutun des Untersuchers entstanden waren, und auch nicht durch den Kontakt mit neuen sich ihnen anbietenden Oberflächen Thrombozytenagglomerate in Erscheinung treten ließen. Die Plasmen wurden auch mikroskopisch daraufhin untersucht.

- d) Plasmen, in denen von vornherein, d. h. direkt nach ihrer Bereitung Agglomerate vorhanden waren, reagierten alle sofort auf Zugabe von Heparinoid-Geigy mit sehr starker Agglomeration.
- e) Eine Abhängigkeit der Agglomerationstendenz der Kainincenthrombozyten von der Konzentration an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen konnte auch festgestellt werden. Versuche hierzu wurden in Analogie zu den entsprechenden Versuchen mit Menschenthrombozyten durchgeführt.

Ergebnis bzw. Deutung der Kurven Abb. 5, Seite 31:

1. Kurven 1 und 2 wurden mit thrombozytenreichem Plasma desselben Tieres ermittelt: Kurve 1 entstand unter Zusatz von 0,1 mg Heparinoid-Geigy/ml sofort nach Bereitung des Plasmas. Kurve 2 wurde ermittelt, nachdem das Plasma 2 Stunden gestanden hatte. Aus ihrem steileren Verlauf läßt sich ablesen, daß die Thrombozyten schneller agglomeriert sind.

2. Kurve 3 entstand mit dem Plasma eines anderen Tieres und zeigt im Vergleich mit Kurve 1 die individuellen Unterschiede in der Empfindlichkeit der Thrombozyten gegenüber Heparinoid-Geigy. Der Verlauf dieser Kurve gibt die Agglomeration auch direkt nach Bereitung des thrombozytenreichen Plasmas wieder.

E) Zur Feststellung, ob sich die agglomerierende Wirkung von Heparinoid-Geigy und ADP auf Kanincenthrombozyten gegenseitig verstärken

setzt man vier Reagensgläser nebeneinander, beschickt sie folgendermaßen:

- |     |                                                                  |
|-----|------------------------------------------------------------------|
| I   | 0,45 ml Plasma + 0,05 ml physiolog. NaCl-Lösung                  |
| II  | 0,45 ml Plasma + 0,05 ml ADP (0,5 $\mu$ )                        |
| III | 0,45 ml Plasma + 0,05 ml Heparinoid-Geigy (0,1 mg)               |
| IV  | 0,45 ml Plasma + 0,05 ml ADP+0,05 ml Heparinoid-Geigy<br>(0,1mg) |

und schüttelt sie alle gleichmäßig durch, so zeigt sich, daß in Glas IV die stärkste Flockung auftritt, Glas I die größte Trübung aufweist, die Flockungserscheinungen in II und III ungefähr gleich stark, jedoch schwächer als in IV sind.

Dieser Effekt läßt sich, wie die folgende Kurve zeigt, auch photometrisch darstellen: Zugabe von Heparinoid-Geigy zeitigt in diesem Fall kaum die Entstehung von Agglomeraten; gemeinsame Anwendung von Heparinoid-Geigy und ADP läßt stärkere Agglomerationen entstehen, als sie unter alleiniger Verwendung von ADP entstanden sind. Interessant ist auch in der Kurve mit ADP alleine, die sich deutlich darstellende spontane Wiederauflösung der Agglomerate. (ADP und Heparinoid-Geigy wurden in dem entsprechenden Versuch gleich-

zeitig dem Plasma beigement. Diese Lysis fehlt in der Kurve mit beiden Agglomerantien fast vollständig. Wie auch in anderen Versuchen festgestellt, ist die Anstiegssteilheit der Kurve mit ADP plus Heparinoid-Geigy stets etwas geringer als die mit ADP alleine. An sich könnte man erwarten, daß dies sich gerade umgekehrt verhält, da mit ADP und Heparinoid-Geigy insgesamt eine relativ größere Menge an agglomerierender Substanz zu Substrat gegeben wird.

Siehe folgende Abb. 6, Seite 52, von Kaninchen 41!

F) Untersuchungen über die Hemmbarkeit der agglomerierenden Wirkung von Heparinoid-Geigy durch Adenosin und AMP in vitro mit Kaninchen Thrombozyten

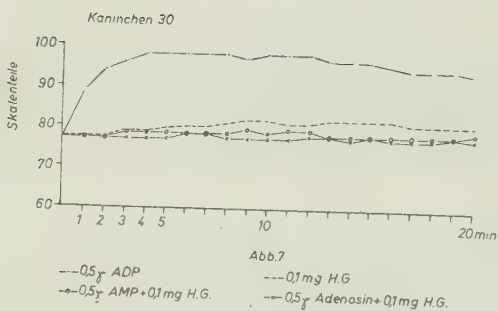
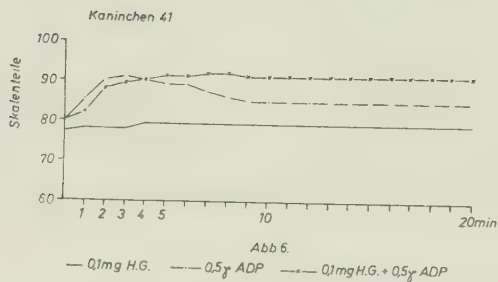
Daß Adenosin und AMP Agglomerate, die durch ADP hervorgerufen sind, schneller aufzulösen und auch die Bildung der Agglomerate zu hemmen vermögen, wurde bereits in dem Kapitel über die Thrombozytenagglomeration unter der Wirkung von ADP veranschaulicht.

Verwendete Dosen:

|                         |                                      |   |
|-------------------------|--------------------------------------|---|
| 0,1 mg Heparinoid-Geigy | zu 0,8 ml thrombozytenreichem Plasma |   |
| 0,5 $\mu$ ADP           | zu 0,8 ml "                          | " |
| 0,5 $\mu$ AMP           | zu 0,8 ml "                          | " |
| 0,5 $\mu$ Adenosin      | zu 0,8 ml "                          | " |

So nur Heparinoid-Geigy, ADP oder AMP dem Plasma zugegeben wurde, kamen noch zur Erreichung des 1,0 ml 0,1ml physio-log. NaCl-Lösung dazu.

Siehe Abb. 7, Seite 52



### Ergebnis:

1. Bei Verwendung von 0,5% ADP zeigt sich ein viel stärkerer Effekt auf die Thrombozytenagglomeration als bei Anwendung von 100% (= 0,1 mg) Heparinoid-Geigy, gewichtsmäßig also der 200-fachen Menge.
2. Adenosin und AMP vermögen die Agglomerationswirkung von Heparinoid-Geigy zu hemmen.
3. Wenn gleich auch die Kurve von AMP + Heparinoid-Geigy über der von Adenosin + Heparinoid-Geigy liegt, sind doch die Unterschiede in ihrem Verlauf so gering, daß man sagen kann, die hemmende Wirkung von Adenosin und AMP auf die durch Heparinoid-Geigy hervorgerufene Thrombozytenagglomeration ist ungefähr gleich. Diese Aussage wird durch andere analog ausgeführte Versuche bestätigt, in denen zwar auch eine die Thrombozytenagglomeration hemmende Wirkung von AMP und Adenosin vorhanden war. Dabei lagen die Kurven von Adenosin + Heparinoid-Geigy und AMP + Heparinoid-Geigy in ähnlicher Weise wie in den zuletzt gezeigten Kurven von Kaninchen 30 nahe beieinander, überschritten sich z. T. so, daß die Kurve von Adenosin + Heparinoid-Geigy über die von AMP zu liegen kam.
4. Eine geringfügige Lysis der Agglomerate durch Adenosin und AMP konnte festgestellt werden.

### Zusammenfassung:

1. AMP und Adenosin können, wie bei ADP schon gezeigt, die thrombozytenagglomerierende Wirkung von Heparinoid-Geigy hemmen und die Auflösung der Agglomerate beschleunigen.
2. AMP und Adenosin kommen bei Verwendung gleicher Gewichtsmengen ungefähr gleiche Wirkung zu.

3. Dadurch, daß die durch Heparinoid-Geigy hervorgerufene Thrombozytenagglomeration sowohl von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration abhängig, als auch durch Adenosin und AMP hemmbar ist, kann vermutet werden, daß das Heparinoid-Geigy zunächst aus den Thrombozyten ADP freisetzt, welches dann erst Agglomeration hervorruft.

G) Vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit von

- a) Chondroitinsulfat
- b) Eleparon (Luitpoldwerke)
- c) Heparin-Novo
- d) SP 54 (Dr. Bene-Chemie)
- e) Thrombozid (Dr. Bene-Chemie)
- f) Heparin-Choay
- g) Heparinoid-Geigy

auf die Thrombozytenagglomeration in vitro beim Kaninchen

Alle oben erwähnten Stoffe vermögen, wenn auch in unterschiedlicher Stärke, Kaninchenthrombozyten zu agglomerieren. (Bei der Blutentnahme wurde jeweils 1/5 Natr.citr. 3,8 %ig vorgelegt.) Die Versuche wurden nicht nach quantitativen, sondern qualitativen Gesichtspunkten durchgeführt.

1. Beispiel:

Stärke der Kaninchenthrombozytenagglomeration makroskopisch betrachtet nach Beschickung der Objektträger

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Heparinoid-Geigy            | ++++    |
| Heparin-Choay               | +++     |
| Eleparon                    | ++ (+)  |
| Chondroitinsulfat           | +       |
| Thrombozid (Dr.Bene-Chemie) | +++ (+) |
| SP 54 (Dr. Bene-Chemie)     | +++ (+) |
| Heparin-Novo                | + (+)   |
| Leerwert                    | Ø       |

1 ml der Proben enthielt jeweils 1 mg der entsprechenden Substanz.

2. Beispiel siehe Tabelle S. 55

Beispiel:

| <u>mikroskopisch</u> |                |                  | <u>makroskopisch nach 2 h abgelesen</u> |                |                  |        |
|----------------------|----------------|------------------|-----------------------------------------|----------------|------------------|--------|
| <u>Hep.Novo</u>      | <u>Heparon</u> | <u>Hep.Geigy</u> | <u>Hep.Novo</u>                         | <u>Heparon</u> | <u>Hep.Geigy</u> |        |
| mg%                  | +              | +                | ++++                                    | +              | +                | ++++   |
| mg%                  | (+)            | +                | ++ (+)                                  | (+)            | +                | +++    |
| mg%                  | +              | +                | +++                                     | (+)            | +                | +++    |
| mg%                  | (+)            | ++ (+)           | +++(+)                                  | (+)            | ++(+)            | +++(+) |
| mg%                  | (+)            | +++              | ++++                                    | (+)            | +++              | ++++   |
| mg%                  | +++            | ++               | ++ (+)                                  | +++            | ++(+)            | ++++   |
| mg%                  | ++(+)          | +                | ++ (+)                                  | ++ (+)         | ++               | +++    |

Hep.Novo = Heparin-Novo

Hep.Geigy = Heparinoid-Geigy

Ergebnisse:

1. Auf eine definitive Deutung der angeführten Beispiele in dem Sinne, daß beispielsweise Heparinoid-Geigy in 2 mg %iger Lösung 4 mal so stark agglomeriert als Heparin-Novo der gleichen Konzentration, muß hier verzichtet werden, da die Betrachtung und Beurteilung verschiedener Objektträger mit verschiedenen Proben unter dem Mikroskop zu subjektiv ist. Die angegebenen Kreuze sollen lediglich eine ungefähre Aussage machen über das Ausmaß der beobachtlichen Agglomeration.
2. Daß oben aufgeführte Stoffe in vitro agglomerierend wirken, wenn auch mit verschiedener Stärke, wurde bereits erwähnt.

VI.

Versuche zur Feststellung der Wirkung von Heparinoid-Geigy, Heparin-Novo und Elexaron auf die Thrombozytenagglomeration in vivo beim Kaninchen unter besonderer Berücksichtigung von Heparinoid-Geigy

A) Versuchsbedingungen:

1. Verwendete Inhibitoren:

- a) Natr. citr. 3,8 %ig
- b) Sequestren 1 %ig
- c) Magnesiumsulfat 14 %ig

2. Zählmethode nach Feissly-Lüdin in einer Modifikation nach MARX-DERLATH (siehe Versuchsbedingungen Kapitel II/B). Ob mit Leukozyten- oder Erythrozytenzählpipette gearbeitet worden ist, wird bei jedem Versuch vermerkt sein.

3. Der Benthau-Test:

Sinn des Benthau-Tests ist es, die Retraktion (in Citrat- bzw. Magnesiumsulfatplasma oder -blut) eines Fibringerinnsels innerhalb einer genormten Zeit in Abhängigkeit der Anzahl der vorhandenen Thrombozyten zu messen. Als Maß für die Retraktion gilt der Quotient, welcher sich aus der Abmessung der Länge und Dicke (in cm ausgedrückt) des von der Flüssigkeitsoberfläche in das freie Lumen des Reagensglases herabhängenden Thrombus nach einer bestimmten Zeit ergibt. Je geringer die Thrombozytenzahl, desto schwächer ist ceteris paribus die Retraktion.

Durchführung des Tests:

- a) 0,4 ml physiolog. NaCl-Lösung in ein sauberes Reagensglas einpipettieren,
- b) dazu 2 - 3 Tropfen Thrombokinase (selbst hergestellt aus azetongetrocknetem Humanhirn)
- c) 0,5 ml Inhibitorblut bzw. -plasma einpipettieren plus
- d) 0,25 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (1 %ig)
- e) gerinnen lassen
- f) durch Drehen des Reagensglases in seiner Längsachse den Thrombus von der Gefäßwand lösen.

- g) Die Probe(n) bei 37°C in den Brutschrank stellen.
- h) Abmessung des Thrombus nach bestimmter Zeit; in meinen Versuchen nach 2 Stunden.
4. Der Ansatz des TEG's wurde bei den Versuchen mit ADP bereits beschrieben.
5. Zur Ausschaltung des Effektes von Heparinoid-Geigy in Blut oder Plasma durch "Protamin" (Firma Roche; liegt in 1 %iger Lösung vor)
- a) Zunächst wird die Thrombinzeit mit einer nicht heparinisierten Plasmaprobe desjenigen Tieres bestimmt, dessen Blut nachher inhibiert werden soll:

Ansatz:

0,18 ml Plasma + 0,02 ml physiolog. NaCl-Lösung + 0,2 ml Thrombokinase (10 E/ml)

Die durch diese Methode ermittelte Zeit gilt als "Normalwert" für dieses Tier.

- b) Protamin wird in entsprechenden Verdünnungen angesetzt. (Zu konzentriert vermag es die Gerinnung wiederum zu hemmen.)  
Jeweils 0,02 ml Protaminlösung bestimmten Verdünnungsgrades werden zu 0,18 ml heparinisierten Plasmas gegeben. Es muß derjenige Verdünnungsgrad von Protaminlösung gefunden werden, der zu 0,18 ml inhibiertem Plasma oder Blut gegeben, die damit ermittelte Thrombinzeit auf den vorher festgestellten "Normalwert" zurückkehren läßt.

Für den Ansatz des TEG's bedeutet das dann, daß (auf die verwendete Menge Blut oder Plasma umgerechnet) zu 0,25 ml heparinisiertem Blut bzw. Plasma 0,05 ml der ermittelten Protaminverdünnung gegeben werden.

Für den Benthau-Test gilt:

0,46 ml heparinisiertes Material plus 0,04 ml ausgetestete Protaminlösung.

6. Thrombozytenauszählung nach Fonio in eigener Modifikation:

- a) Nicht auf die Stichstelle wurde 14 %ige Magnesiumsulfatlösung getropft, sondern auf einen gereinigten Objektträger ein Tropfen! Das Blut wurde auch nicht, wie von Fonio angegeben, aus einer mit einer Hämostilette erzeugten Stichstelle entnommen, da dies beim Kaninchen viel schwerer ist als beim Menschen. Vielmehr wurde aus einer in der Ohrvene des Kaninchens steckenden Injektionsnadel, aus der eben noch mit einer Spritze Blut entnommen worden war, ein Tropfen Blut auf den Tropfen Magnesiumsulfat fallengelassen. Nach kurzer Durchmischung erfolgte der Ausstrich auf dem Objektträger.
- b) Nach Lufttrocknung des Ausstriches färbte man nach Pappenheim.
- c) Auf je 500 Erythrozyten wurden die Thrombozyten und eventuell vorkommende Agglomerate gezählt.

B) Orientierender Versuch zur Untersuchung der Beeinflussbarkeit der Thrombozytenagglomeration durch Heparinoid-Geigy, Elexaron und Heparin-Novo in vivo beim Kaninchen

Vorbemerkung:

- a) Es wurden jeweils 2 ml Blut entnommen, die 1/5 Citrat enthielten.
- b) Nach Injektion des entsprechenden Pharmakons wurde das Blut aus dem Ohr der gegenüberliegenden Seite entnommen.
- c) Zur Auszählung der Thrombozyten im Kaninchenblut wurden Erythrozytenzählpipetten verwendet und jeweils eine doppelte Neubauerzählkammer ausgezählt. Die angegebenen Thrombozytenzahlen stellen also jedesmal den Mittelwert aus zwei Zählungen dar.

Ergebnisse: (bezogen auf die Tabelle Seite 60)

1. Bei drei von acht untersuchten Kaninchen nahm die Zahl der Thrombozyten nach Injektion von 10 mg Heparinoid-Geigy/kg Körpergewicht deutlich ab (siehe umrandete Felder der Tabelle!). Dabei wurden nur solche Zählergebnisse gewertet, die, wenn man sie in Abhängigkeit von der Zeit graphisch darstellte, eine Kurve mit nur einem "Tal" ergäben und nicht mit zwei "Tälern" (siehe Abb. 8, Seite 59).

Außerdem mußten die Unterschiede zwischen den einzelnen Zählergebnissen größer sein als 5 %, da ein geringerer Unterschied noch innerhalb der Zählgenauigkeit der verwendeten Zählmethode gelegen hätte. Von der Annahme ausgehend, daß das Heparinoid-Geigy vom Moment der Injektion an im Körper Vorgängen unterliegt, die es unwirksam machen, wäre es nicht vorstellbar, daß unter der Wirkung von Heparinoid-Geigy einmal die Thrombozyten agglomerieren, die Agglomerate sich wieder lösen, sich noch einmal Agglomerate bilden, die dann erneut einer Auflösung unterliegen. Die Ergebnisse, die mit den verschiedenen Tieren erhalten worden waren, konnten in derselben Weise mit ihnen reproduziert werden. Dies gilt sowohl für jene, deren Thrombozyten entsprechend den Zählergebnissen nicht mit Agglomeration auf Injektion von Heparinoid-Geigy reagiert hatten, als auch für jene, bei denen Agglomerate aufgetreten waren.

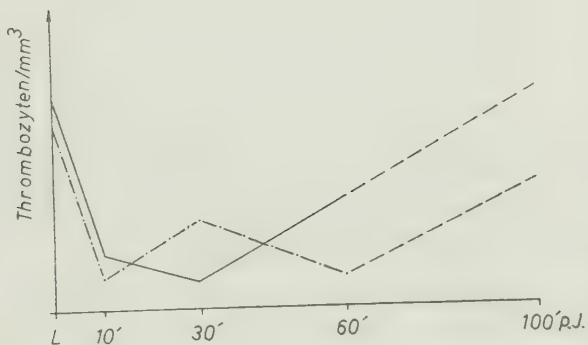


Abb. 8.

Die angegebenen Thrombozytenzahlen stellen also jeweils den Mittelwert aus zwei Zählungen dar.

## 2. Durchführung

| Kanin-<br>chen<br>Nr. | Gewicht<br>(g) | Inj. Dosis<br>(mg) | Leerwert  | 10' p.J. | 30' p.J. | 60' p.J. | 24h p.J. |                   |
|-----------------------|----------------|--------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|-------------------|
| 22                    | 5150           | 51,5               | 785.400   | 852.000  | 854.000  | 767.000  |          | Heparinoid-Gelely |
| 7                     | 5000           | 50,0               | 939.000   | 140.000  | 51.000   | 96.000   | 157.000  |                   |
| 19                    | 5150           | 51,5               | 1.145.000 | 992.000  | 906.000  | 978.000  |          |                   |
| 30                    | 4800           | 48,0               | 765.000   | 456.000  | 474.000  | 393.000  |          |                   |
| 28                    | 6500           | 65,0               | 429.000   | 36.000   | 402.000  | 420.000  |          |                   |
| 41                    | 4700           | 47,0               | 570.000   | 528.000  | 519.000  |          |          |                   |
| 2                     | 6150           | 61,5               | 582.000   | 24.000   | 35.000   | 18.000   | 57.000   | Heparin-Novo      |
| 5                     | 4000           | 40,0               | 585.000   | 33.000   | 41.500   | 47.000   | 423.000  |                   |
| 22                    | 5150           | 51,5               | 1.076.000 | 897.000  | 960.000  | 873.000  | 765.000  |                   |
| 19                    | 5150           | 51,5               | 645.000   | 663.000  | 743.000  | 741.000  | 621.000  |                   |
| 28                    | 6500           | 65,0               | 393.000   | 318.000  | 132.000  | 408.000  | 417.000  |                   |
| 30                    | 4800           | 48,0               | 573.000   | 458.000  | 466.000  | 514.000  | 504.000  |                   |
| 41                    | 4700           | 47,0               | 523.000   | 486.000  | 519.000  | 522.000  | 405.000  | Eleparon          |
| 2                     | 6150           | 61,5               | 414.000   | 318.000  | 153.000  | 384.000  | 462.000  |                   |
| 5                     | 4000           | 40,0               | 534.000   | 462.000  | 234.000  | 252.000  | 613.000  |                   |
| 43                    | 5100           | 51,0               | 570.000   | 420.000  | 36.000   | 33.000   |          |                   |
| 44                    | 5000           | 50,0               | 421.000   | 27.000   | 51.000   | 51.000   |          |                   |
| 42                    | 4000           | 40,0               | 717.000   | 687.000  | 673.000  | 696.000  |          |                   |
| 22                    | 5150           | 51,5               | 721.000   | 675.000  | 777.000  | 741.000  |          | Eleparon          |
| 15                    | 5000           | 50,0               | 294.000   | 27.000   | 33.000   | 48.000   |          |                   |
| 19                    | 5150           | 51,5               | 789.000   | 998.000  | 798.000  | 861.000  |          |                   |

p. J. = post Injectionem

2. Bei keinem von 7 untersuchten Kaninchen konnte nach Injektion von 10 mg Heparin-Novo/kg Körpergewicht eine Abnahme der Thrombozyten in deutlicher Weise festgestellt werden.
3. Bei drei von sechs untersuchten Tieren wurde nach Injektion von 10 mg Eleparon/kg Körpergewicht eine Abnahme der Thrombozyten gefunden. Die Auswertung der Zähl-ergebnisse erfolgte dabei nach denselben Gesichtspunkten, wie unter 1. von erläutert.
4. Bei der Auszählung der Thrombozyten nach Injektion von Heparinoid-Geigy bzw. Eleparon waren, wenn deren Zahl abnahm, teilweise Agglomerate in der Zählkammer zu sehen, dies jedoch nicht immer. Zentrifugierte man das Blut, nachdem man davon eine Probe zur Auszählung entnommen hatte, (3 Min. lang bei 800 U/Min.), so erschienen die Plasmen derjenigen Blutproben, in denen weniger Thrombozyten gezählt werden konnten, klarer als das Plasma des Leerwertes. Dasselbe Phänomen wurde von SCHWEIGHARDT (30), einer Doktorandin von MARX, 1957 beobachtet.

Beispiel:

(p.J. = post injectionem) 1/10 Natr.citr.

|           | <u>Plasma</u> | <u>Thrombozyten/mm<sup>3</sup></u> |
|-----------|---------------|------------------------------------|
| Leerwert  | trüb          | 403.200                            |
| 5' p. J.  | klar          | 6.000                              |
| 10' p. J. | klar          | 4.000                              |
| 30' p. J. | klar          | 13.200                             |
| 60' p. J. | klar          | 28.000                             |

C) Zur Beantwortung der Frage nach der Bildung der Agglomerate durch Injektion von Heparinoid-Gelee beim Kaninchen in vivo oder in vitro

1. Zunächst war zu klären, ob dem verwendeten Natr.citr. ein agglomerierender Effekt in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors in der verwendeten Blut- bzw. Plasmaprobe zukommt.

Bei der Blutabnahme von ein und demselben Tier wurde einmal nur 1/10 und dann 1/5 Citrat vorgelegt. Unterschiede ließen sich beim Auszählen der Thrombozyten nicht feststellen. Um aber den Effekt von Natriumcitrat weitgehendst auszuschalten, wurde mit 1/10 Citrat gearbeitet, - einer Menge, die die Gerinnung von Kaninchenblut sicher noch verhindert. Um eine eventuell von Seiten des Natr.Citr. auftretende agglomerationsfördernde Wirkung aufzudecken, wurde vergleichsweise von demselben Tier Blut mit 1/10 14 %iger Magnesiumsulfatlösung abgenommen. Unterschiede der Thrombozytenzahlen und bezüglich des Auftretens der Agglomerate konnten nicht festgestellt werden (siehe nachfolgendes Beispiel 2, Seite 64; Leerwert). Eventuell doch auftretende Unterschiede in den Thrombozytenzahlen sind auf Ungenauigkeiten in der Blutabnahme zurückzuführen.

2. Die Hauptfrage, ob sich nun Agglomerate nach der Injektion in vivo oder in vitro bilden, bleibt nun noch zu klären. Zu diesem Zwecke wurden der Benthau-Test, das TEG und die Thrombozytenauszählung nach Fonio in eigener Modifikation verwendet.

Bemerkung zu Beispiel 1:

Es ist auffällig, daß die Beurteilung des Trübungsgrades der durch Zentrifugieren hergestellten Plasmen zwischen 1/5 Natriumcitrat und 1/5  $MgSO_4$  nicht miteinander übereinstimmen. Bei der mikroskopischen Betrachtung der  $MgSO_4$ -Plasmen fielen bei 5', 15', 30' und 60' post injectionem Ausfällungen in Form kleiner Partikelchen auf, die denen ähnelten, welche

durch Mischung von Novocain mit Heparinoid-Geigy in entsprechendem Verhältnis entstehen. Die dadurch entstehende Trübung hatte also makroskopisch ein Vorhandensein nicht agglomerierter Thrombozyten vorgetäuscht.

Beispiel 1: Kaninchen 2, 1/10 Citrat, 1/10  $MgSO_4$

|          | Plasma | Thrombo-<br>zyten im<br>Blut | Benthaus<br>im Plasma | Plasma          | Thrombo-<br>zyten im<br>Blut   | Benthaus<br>im Plasma |
|----------|--------|------------------------------|-----------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------------|
| Leerwert | trüb   | 266.400                      | 0,5/0,3               | trüb            | 248.400                        | 0,5/0,3               |
| 5'p.J.   | klar   | 7.200                        | keine Re-<br>traktion | trüb            | 3.600                          | keine Re-<br>traktion |
| 15'p.J.  | klar   | 3.600                        | "                     | trüb            | 4.800                          | "                     |
| 30'p.J.  | klar   | 6.000                        | "                     | trüb            | 6.000                          | "                     |
| 60'p.J.  | klar   | 7.200                        | "                     | etwas<br>klarer | 19.200                         | "                     |
| 120'p.J. | trüb   | 153.600                      | 0,5/0,3               | trüb            | 249.600                        | 0,5/0,3               |
|          |        | <u>1/5 Citrat</u>            |                       |                 | <u>1/5 <math>MgSO_4</math></u> |                       |

Ergebnisse:

1. Sowohl im Citrat- als auch im Magnesiumsulfatblut nahm die Zahl der Thrombozyten ab.
2. Durch den Ansatz des Benthaus-Tests zeigt sich bei den innerhalb der ersten Stunde nach Injektion entnommenen Proben keine Retraktion. Dies spricht dafür, daß die Zahl der Thrombozyten abgenommen hat. Die Retraktion im Benthaus-Test ist ja lediglich (wie schon bemerkt), von der Gesamtzahl der in der Probe vorhandenen Thrombozyten abhängig, egal ob freiliegend oder agglomeriert.

Beispiel 2: Kaninchen 5

1/10 Citrat, 1/10 MgSO<sub>4</sub>

|             | Plasma      | Tz. im Blut | Benthaus im Blut       | Plasma      | Tz. im Blut | Benthaus im Blut | Fonio auf 500 Erys               |
|-------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|------------------|----------------------------------|
| Leerwert    | trüb        | 367.200     | 1,2/0,6                | trüb        | 362.400     | 1,2/0,6          | 124 Tz.+14 Aggl.                 |
| 5'p.J.      | klar        | 6.000       | 3,2/1,3                | trüb        | 7.200       | 2,5/1,5          | 2 Tz.+ 3 Aggl.                   |
| 15'p.J.     | klar        | 6.000       | 3,0/1,2                | spur klarer | 7.200       | 2,5/1,5          | ∅ Tz.+8 Riesen aggl.<br>+3 Aggl. |
| 30'p.J.     | spur trüber | 13.200      | 1,8/0,9                | spur klarer | 19.200      | 1,7/0,8          | ∅ Tz.+1 Riesen aggl.             |
| 60'p.J.     | noch trüber | 16.600      | 1,5/0,6                | spur klarer | 40.800      | 1,7/0,8          | 30 Tz.+2 Aggl.                   |
| 120'p.J.    | trüb        | 252.000     | 1,5/0,6                | trüb        | 365.800     | 1,2/0,6          | 45 Tz.+4 Aggl.                   |
| 1/10 Citrat |             |             | 1/10 MgSO <sub>4</sub> |             |             |                  |                                  |

Tz. = Thrombozyten

Aggl. = Agglomeration

p. J. = post injectionem

TEG's aus Citratblut

| <u>Üblicher Ansatz</u> |                 |                | <u>Ansatz: 0,25 ml Citratblut +<br/>+ 0,05 ml Protamin<br/>Verd. 1:10.000</u> |                |                |
|------------------------|-----------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| r                      | K <sub>1</sub>  | M <sub>ε</sub> | r                                                                             | K <sub>1</sub> | M <sub>ε</sub> |
| Leerwert               | 7 1/2' 3'       | 60             | 7 1/2' 3'                                                                     |                | 50             |
| 5'p.J.                 | keine Gerinnung |                | 9 1/2' 5'                                                                     |                | 43             |
| 15'p.J.                | "               | "              | 10' 5 1/2'                                                                    |                | 33             |
| 30'p.J.                | "               | "              | 5 1/2' 3'                                                                     |                | 55             |
| 60'p.J.                | "               | "              | 8' 7'                                                                         |                | 41             |
| 120'p.J.               | 12' ?           | 46             | 9 1/2' 4 1/2'                                                                 |                | 69             |

p.J. = post injectionem

M<sub>ε</sub> in mm ausgedrückt

Ergebnisse zu Beispiel 2 (Kaninchen 5, Seite 64):

1. In diesem Fall zeigten die Auszählungen nach Injektion von Heparinoid-Geigy eine Abnahme der Thrombozyten.
2. Die Retraktion im Benthau-Test ist zwar in den während der ersten Stunde nach Injektion entnommenen Proben im Gegensatz zum Beispiel 1 nicht völlig aufgehoben, aber deutlich vermindert.

3. Wenn man von den im Leerwert beobachteten Agglomeraten in den Ausstrichpräparaten absieht, geht doch aus der Betrachtung der Präparate hervor, daß nach Injektion von Heparinoid-Geigy weniger freiliegende Thrombozyten mit dem Blute aus der Injektionsnadel auf den Objektträger gelangten, während sich massive Agglomerate zeigten. Selbst wenn man einräumt, daß durch die Blutentnahme einige Agglomerate entstanden sind, ist es doch durchaus denkbar, daß Agglomerate intravasal entstanden und mit dem aufgefangenen Blutstropfen nach außen gelangt sind.
4. Das TEG zeigt nach Zusatz von Protaminsulfat bis auf den Wert 30' p.J. eine deutliche Abnahme der Maximalamplitude ( $M_C$ ), was auch wiederum für eine Minderung der Gesamtzahl der in der Blutprobe vorhandenen Thrombozyten spricht.

Da Sequestren die Agglomeration der Thrombozyten hemmt, wurde es im folgenden Versuch verwendet, um ganz sicher zu gehen, daß dem Natr.citr. und dem Magnesiumsulfat kein agglomerierender Effekt zukommt.

Beispiel 3, Seite 68

TEG im Citratblut

| <u>üblicher Ansatz</u> |                 |                | <u>Ansatz mit Protaminsulfat<br/>1 : 5 verd.</u> |                |                |
|------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------------------------|----------------|----------------|
| r                      | K <sub>1</sub>  | M <sub>ε</sub> | r                                                | K <sub>1</sub> | M <sub>ε</sub> |
| Leerwert               | 9'              | 41             | 13'                                              | 14'            | 32             |
| 5'p.J.                 | keine Gerinnung |                | 29'                                              | 21'            | 37             |
| 15'p.J.                | "               | "              | 27'                                              | 19'            | 31             |
| 30'p.J.                | "               | "              | 24'                                              | 15'            | 32             |
| 60'p.J.                | "               | "              | 22 1/2'                                          | 29'            | 40             |

Fonio-Ausstrichpräparate

Auf je 500 Erys:

|          | <u>einzelnen liegende<br/>Thrombozyten</u> | <u>Agglomerate</u> |
|----------|--------------------------------------------|--------------------|
| Leerwert | 67                                         | 1                  |
| 5'p.J.   | 3                                          | Ø                  |
| 15'p.J.  | Ø                                          | 2                  |
| 30'p.J.  | Ø                                          | 3                  |
| 60'p.J.  | 5                                          | 6                  |

Beispiel 3: Kaninchen 2

1/10 Citrat, 1/10 Sequestren, 1/10  $\text{MgSO}_4$  (14 %ig)

|          | <u>Plasma</u> | <u>Tz. im Blut</u> | <u>Benthaus üblicher Ansatz</u> | <u>Benthaus mit Protaminsulfat Vera. 1:5</u> |                                                         |
|----------|---------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Leerwert | trüb          | 381.000            | 1,0/0,5                         | 1,0/0,5                                      | <div> <div>1</div> <div>1/10 Citrat</div> </div>        |
| 5'p.J.   | klar          | 7.200              | 3,0/1,1                         | abgerissen                                   |                                                         |
| 15'p.J.  | klar          | 7.200              | 2,7/1,1                         | 2,3/0,8                                      |                                                         |
| 30'p.J.  | klar          | 4.800              | 2,7/1,0                         | 2,4/0,9                                      |                                                         |
| 60'p.J.  | spur trüber   | 27.600             | 1,8/0,7                         | 1,8/0,6                                      |                                                         |
| Leerwert | trüb          | 432.000            | 1,0/0,5                         | 1,0/0,7                                      | <div> <div>1/10 Sequestren</div> </div>                 |
| 5'p.J.   | klar          | 7.200              | 3,0/1,0                         | 2,8/1,0                                      |                                                         |
| 15'p.J.  | klar          | 2.400              | abgerissen                      | 2,3/1,0                                      |                                                         |
| 30'p.J.  | klar          | 6.000              | 3,0/0,8                         | 2,3/0,9                                      |                                                         |
| 60'p.J.  | trüber        | 34.800             | 1,5/0,5                         | 1,5/0,7                                      |                                                         |
| Leerwert | trüb          | 376.000            | 1,2/0,7                         | 1,2/0,7                                      | <div> <div>1/10 <math>\text{MgSO}_4</math></div> </div> |
| 5'p.J.   | trüb          | 6.000              | 3,0/1,5                         | 1,7/1,0                                      |                                                         |
| 15'p.J.  | trüb          | 8.400              | 3,0/1,2                         | 3,0/1,3                                      |                                                         |
| 30'p.J.  | trüb          | 10.800             | 2,7/0,8                         | 2,7/1,1                                      |                                                         |
| 60'p.J.  | etwas klarer  | 31.200             | 1,6/0,7                         | 2,5/0,8                                      |                                                         |

Ergebnisse zu Beispiel 3, Kaninchen 2, Seite 67 und 68:

1. Dieser Versuch zeigt wieder die Abnahme der zählbaren Thrombozyten nach Injektion von Heparinoid-Geigy in dreifacher Auszählung mit drei verschiedenen Inhibitoren.
2. Die jeweils parallel angesetzten Benthau-Tests (einmal mit und einmal ohne Protamin) lassen zwar eine geringfügige Steigerung der Retraktion nach Ausschalten der Wirkung von Heparinoid-Geigy durch Protamin erkennen; trotzdem ist die Retraktion wie in den vorangegangenen Versuchen gegenüber dem Leerwert deutlich gemindert. Stärke der Retraktion und Anzahl der ausgezählten Thrombozyten entsprechen einander ungefähr.
3. Die Betrachtung der Blutausstrichpräparate läßt in diesem Versuch besonders deutlich erkennen, daß nach Injektion von Heparinoid-Geigy relativ wenige Thrombozyten, dafür aber mehr Agglomerate in den Blutstropfen zu finden waren.
4. Das TEG: Eine Verschmälerung der  $M_C$  konnte nicht festgestellt werden;  $K_1$  erschien jedoch verlängert, was auch dafür spricht, daß weniger Thrombozyten vorhanden waren.

Zusammenfassung:

Zunächst bestand die Frage, ob durch i. v. Injektion von Heparinoid-Geigy beim Kaninchen in vivo Agglomerate entstehen. In einer Versuchsserie, relativ einfach durchzuführender Versuche, schien das tatsächlich möglich zu sein, wenngleich hierbei individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit der Thrombozyten einzelner Tiere gegenüber Heparinoid-Geigy auch in vivo feststellbar waren.

Dabei traten jedoch Zweifel auf, ob nicht das Natriumcitrat selbst, in Abhängigkeit seiner Konzentration in - v i t r o ,

Agglomerate bildete. Die Verwendung von Magnesiumsulfat und Sequestren in derselben Konzentration wie Natriumcitrat ließen diesen Zweifel schon unwahrscheinlicher erscheinen, da selbst mit Sequestren, welches besonders suspensionsstabilisierend auf Thrombozyten wirkt, dieselben Ergebnisse gezeitigt werden konnten. Zudem fanden diese durch den Benthau-Test und das TEG ihre Bestätigung. Bleibt nur noch die Frage nach dem Verbleib der Thrombozyten in vivo zu klären:

Wenn man nach den bisherigen Resultaten der durchgeführten Versuche zur Annahme berechtigt ist, durch Injektion von Heparinoid-Geigy bildeten sich in vivo Agglomerate, so ist man außerdem berechtigt anzunehmen, daß diese Agglomerate ab einer bestimmten Größe bis zu ihrer Wiederauflösung in Kapillaren entsprechenden Lumens festgehalten werden, z. B. in der Lunge. (NORDÖY (15), der ADP in relativ hohen Dosen Ratten intravenös injizierte, fand in deren Lungenkapillaren massive Thrombozytenagglomerate, die sich jedoch relativ schnell wieder auflösten.) Ein Teil der Agglomerate ist dabei so klein, daß er wieder in die größeren Gefäße und somit durch eine Blutentnahme zur Erkennung gelangen kann. Allmählich werden aber die großen Agglomerate auch abgebaut, indem sich zunächst Teile ablösen, welche wiederum zerfallen, bis die Thrombozyten wieder alleine liegen. Sobald sie die größeren Gefäße erreicht haben, sind sie auch mengenmäßig durch Blutentnahme erfaßbar. So erklärt sich auch das Aussehen der zuletzt betrachteten Ausstrichpräparate:

Im Leerwert sehr viele Einzellieger; nach 5' nur noch sehr wenige einzelliegende Thrombozyten und kein Agglomerat, was dafür spricht, daß die Agglomerate noch zum größten Teil in den Kapillaren festgehalten werden. Allmählich erscheinen die Agglomerate und schließlich nach 60' mit ihnen auch wieder die Einzellieger.

Letztlich läßt sich also mit einiger Sicherheit aussagen, daß Heparinoid-Geigy nicht nur in vitro, sondern auch in vivo, bei Vorhandensein einer gewissen individuellen Empfindlichkeit der Thrombozyten der einzelnen Versuchstiere gegenüber Heparinoid-Geigy, Thrombozytenagglomerate hervorzurufen vermag.

## VII.

### Verhinderung und Reversibilität der durch ADP und Heparinoid-Geigy hervorgerufenen Thrombozytenagglomeration mit Ammoniumsulfatlösung in vitro mit Kaninchenthrombozyten

Wie bereits beschrieben, können durch entsprechende Mengen ADP oder Heparinoid-Geigy in vitro mit Kaninchenthrombozyten Agglomerate hervorgerufen werden. Dabei taucht die Frage auf, ob Heparinoid-Geigy die Thrombozytenagglomeration direkt oder dadurch veranlaßt, daß zunächst durch das Heparinoid-Geigy ADP frei wird, welches dann erst die Agglomeration verursacht.

Neben der Möglichkeit, eventuell frei gewordenes ADP enzymatisch nachzuweisen, schien mir folgender Weg einfacher zu sein:

Wie aus der Erläuterung des Prinzips der enzymatischen Bestimmung von ADP und AMP in der von FA. BOEHRINGER UND SOHNNE, Mannheim (31) und bei BERGMAYER (32) ersichtlich ist, katalysiert die von Colowick und Kalckar 1943 entdeckte Myokinase

folgende Reaktion bis zur Erreichung eines Reaktionsgleichgewichtes:



(Ob diese Myokinase identisch mit der von KERBY und TAYLOR (11) erwähnten Adenylatkinase ist, kann im Moment nicht gesagt werden.)

Liegt in thrombozytenreichem Plasma (durch künstliches Hinzufügen) sehr viel ADP und relativ wenig AMP und ATP vor, so müßte die Reaktion unter der Wirkung von Myokinase bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes in Richtung von AMP und ATP verlaufen. Hat man festgestellt, in wie starkem Maße eine bestimmte Menge von ADP in einem thrombozytenreichen Citratplasma Agglomerate hervorgerufen hat, müßte man durch Zusatz von Myokinase das Ausmaß der Agglomeration verringern können, was sich sehr leicht durch Auszählung beweisen lassen müßte.

Ließe sich dieser Effekt ebenso mit Heparinoid-Geigy und Myokinase hervorrufen, würde er dafür sprechen, daß durch Heparinoid-Geigy ADP freigesetzt wird, welches aber unter der Wirkung von Myokinase (zumindest zum Teil) eine Umwandlung in AMP und ATP erfährt.

Als Myokinase stand mir ein Präparat von Firma Boehringer und Soehne, Mannheim, zur Verfügung. Dabei handelte es sich um eine kristalline Suspension von Myokinase in Ammoniumsulfatlösung (3,2 molar ph ca 6). Da bei Verwendung von Myokinase in dieser Suspension eventuell auftretende Effekte des Suspensionsmittels nicht auszuschließen waren, mußte das Suspensionsmittel im selben Sinne wie Myokinase ausgetestet werden. Dabei verwendete ich eine 3,2 molare Ammoniumsulfatlösung von Fa. Boehringer und Soehne.

Versuchsbedingungen:

1. Abnahme des Blutes beim Kaninchen wie in den übrigen Versuchen. 1/10 Citrat
2. Darstellung des thrombozytenreichen Plasmas wie üblich.
3. Thrombozytenzählung nach der schon beschriebenen Methode.
4. Konzentration der Myokinase: 0,1 mg/ml Substrat.

Ergebnisse, bezogen auf die folgende Tabelle Seite 75

1. Weder Ammoniumsulfatlösung (3,2 molar ph ca. 6), noch Myokinasesuspension rufen in thrombozytenreichem Kaninchenplasma Agglomerate hervor.
2. a) Ammoniumsulfatlösung vermag Agglomeration durch ADP und Agglomeration durch Heparinoid-Geigy fast vollständig zu verhindern.  
b) Ammoniumsulfatlösung löst Agglomerate, die in thrombozytenreichem Kaninchenplasma

|                      |                   |                  |       |
|----------------------|-------------------|------------------|-------|
| $\alpha$ ) durch ADP | } entstanden sind | vollständig      | } auf |
| $\beta$ ) durch H.G. |                   | fast vollständig |       |

3. Myokinasesuspension macht durch

|         |                             |                  |              |
|---------|-----------------------------|------------------|--------------|
| a) ADP  | } entstandene Agglomeration | zum größten Teil | } rückgängig |
| b) H.G. |                             | nur teilweise    |              |

(H.G. = Heparinoid-Geigy)

4. Ein Effekt der Myokinase in der erwarteten Weise konnte nicht festgestellt werden, jedoch wird Ammoniumsulfatlösung (zumindest in der vorliegenden Konzentration) als ein Agens erkannt, das sowohl Agglomeration verhindern, als auch rückgängig machen kann.

Siehe auch nachfolgende Kurven, Abb. 9, Seite 76!

Im Blut läßt sich das Ammoniumsulfat schlecht anwenden, da es teilweise Hämolyse erzeugt.

Der Firma Boehringer und Soehne, Mannheim, sei an dieser Stelle für das kostenlose Überlassen der Lösung gedankt. 1

Versuchsverlauf:

| <u>I. 2' inkubiert, dann Zählung</u> |                           |   | <u>II. 5' inkubiert, dann Zählung</u> |                                 |
|--------------------------------------|---------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------|
| <u>Zugabe von:</u>                   | <u>Tz./mm<sup>3</sup></u> | + | <u>Zugabe von:</u>                    | <u>Tz./mm<sup>3</sup></u>       |
| 0,05 ml NaCl                         | 542.400                   |   | 0,05ml NaCl                           | 543.000                         |
| 0,05 ml NaCl                         | 547.200                   |   | 0,05ml Amm.sulf.l.                    | 542.000                         |
| 0,05 ml NaCl                         | 542.400                   |   | 0,05ml ADP (0,25 $\mu$ )              | 220.800 Aggl.                   |
| 0,05 ml ADP(0,25 $\mu$ )             | 204.000 Aggl.             |   | 0,05ml Amm.sulf.l.                    | 545.200                         |
| 0,05 ml Amm.sulf.l.                  | 556.800                   |   | 0,05ml ADP (0,25 $\mu$ )              | 552.000                         |
| 0,05 ml H.G.(50 $\mu$ )              | 188.600 Aggl.             |   | 0,05ml NaCl                           | 112.800 Aggl.                   |
| 0,05 ml H.G.(50 $\mu$ )              | 175.200 Aggl.             |   | 0,05ml Amm.sulf.l.                    | 465.600 <sup>einige</sup> Aggl. |
| 0,05 ml Amm.sulf.l.                  | 523.200                   |   | 0,05ml H.G.(50 $\mu$ )                | 458.400 "                       |
| 0,05 ml NaCl                         | 535.000                   |   | 0,05ml MK (0,025mg)                   | 549.000                         |
| 0,05 ml ADP(0,25 $\mu$ )             | 163.200                   |   | 0,05ml MK (0,025mg)                   | 463.200 <sup>einige</sup> Aggl. |
| 0,05 ml MK(0,025mg)                  | 544.800                   |   | 0,05ml ADP (0,25 $\mu$ )              | 511.200 "                       |
| 0,05 ml H.G.(50 $\mu$ )              | 120.000 Aggl.             |   | 0,05ml MK (0,025mg)                   | 324.000 "                       |
| 0,05 ml MK (0,025mg)                 | 520.000                   |   | 0,05ml H.G. (50 $\mu$ )               | 392.800 "                       |

z. = Thrombozyten  
 aggl. = Agglomerate  
 . G. = Heparinoid-Geigy

Amm.sulf.l. = Ammoniumsulfatlösung  
 MK = Myokinase

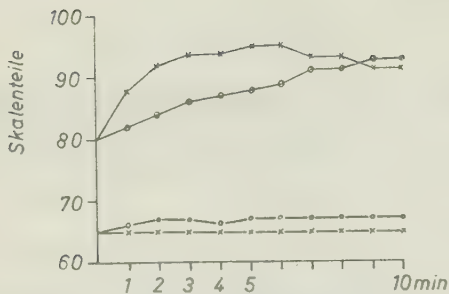


Abb. 9.

--x-- = 1a      --o-- = 2a  
 --o-- = 1b      --x-- = 2b

Bemerkungen zu den obigen Kurven:

Ansätze:

1a = 0,8 ml Plasma + 0,1 ml NaCl + 0,05  $\mu$ ADP (= 0,1 ml)  
 1b = 0,8 ml Plasma + 0,05  $\mu$ ADP + 0,1 mg MK (= 0,1 ml)  
 2a = 0,8 ml Plasma + 0,1 ml NaCl + 0,1 mg H.G. (= 0,1 ml)  
 2b = 0,8 ml Plasma + 0,1 ml H.G. + 0,1 mg MK (= 0,1 ml)

MK = Myokinase  
 H. G. = Heparinoid-Geigy

Die Myokinase wurde jeweils 2' vor dem ADP bzw. dem Plasma beigemischt. Der Ausgangswert mit Myokinase liegt deshalb niedriger (d. h. die Extinktion des Ausgangswertes liegt höher) weil das Plasma durch Zugabe der selbst schon trüben Myokinasesuspension noch zusätzlich getrübt wird.

Beobachtung der Auflösung von Agglomeraten unter dem Mikroskop:

Die Auflösung von Thrombozytenagglomeraten, die unter der Wirkung von ADP entstanden waren, durch Zugabe von Ammoniumsulfatlösung konnte in folgender Weise beobachtet werden:

Zu 1,0 ml thrombozytenreichem Kaninchenplasma wurden 0,5  $\mu$  ADP gegeben und gewartet, bis makroskopisch gut sichtbare Agglomerate aufgetreten waren. Dann wurde 0,1 ml Ammoniumsulfatlösung zugegeben, kurz geschüttelt, mit einer Pipette ein Tropfen des Plasmas auf einen Objektträger fallen gelassen und das Deckglas mit Öl an seinen Rändern versiegelt.

Unter dem Mikroskop fanden sich riesige Agglomerate, deren randständige Thrombozyten sich in heftiger Brown'scher Molekularbewegung befanden. Zunächst erschienen Risse in den großen Agglomeraten; randständig formten sich kleine Ketten (bis zu 15 Thrombozyten), die, hin- und herschlängelnd, den Eindruck machten, als strebten sie von dem großen Agglomerat weg. Schließlich rissen die Ketten, ebenso wie kleinere Agglomeratteile, die nicht unbedingt Kettenform zu haben brauchten, ab und zerfielen unter starker Bewegung in kleinere Einheiten, bis die Thrombozyten wieder einzeln lagen.

## VIII.

### Thrombozytenagglomeration im Myotoxinschock

#### A) Versuchsbedingungen:

##### a) Herstellung eines Frischmuskelextraktes:

5 g der durch einen Fleischwolf gedrehten Muskulatur eines soeben getöteten Kaninchens wurden in 100 ml physiolog. Kochsalzlösung kurz aufgerührt. Diese Frischmuskel-Kochsalzlösung-Suspension wurde 20' bei 15.000 U/Min. bei 4°C in einer "Christzentrifuge" zentrifugiert. Der Überstand kam für die in-vitro-Versuche mit thrombozytenreichem Kaninchen- und Menschenplasma (1/10 3,8 % Natr.citr.) zur Verwendung.

##### b) Darstellung des Myotoxins:

Dabei hielt ich mich im wesentlichen an die Anweisungen von GOOSENS und GASTPAR (10):

#### 1. Herstellung des Trockenmuskels:

Einem durch Genickschlag getöteten Kaninchen wird sofort die Rücken- und Beinmuskulatur entnommen, durch den Fleischwolf getrieben und anschließend in die 5 - 7fache Azetonmenge aufgenommen. Bis zur Aufnahme des Muskels in Azeton sollen nicht mehr als 10 Min. vergangen sein. Man knetet sorgfältig einige Min. mit Azeton durch, entfernt dieses durch ein Haarsieb, wiederholt den gleichen Vorgang noch 2 x und darauf 2 x mit Äther. Auf Filterpapier trocknen die noch ätherfeuchten Muskelfasern rasch bei Zimmertemperatur. 100 g Feuchtmuskelbrei ergeben ungefähr 20 g Trockenmuskel. Dieser kann längere Zeit unter Luftabschluß aufbewahrt werden.

#### 2. Darstellung des Myotoxins

nach der Vorschrift von DYCKERHOFF, SCHÖRCHER und TORRES in der Modifikation nach GOOSENS:  
100 g Trockenmuskel werden 7 Min. lang bei Zimmertemperatur mit 500 ccm physiolog. Kochsalzlösung geschüttelt. Nach Abpressen des Breies durch ein Kolliertuch wird filtriert. (Der Rückstand enthält noch etwas Myotoxin, welches man durch Auskochen gewinnen kann.) Das Filtrat wird 6 - 8 Min. auf der Flamme gekocht, abgekühlt und dann vom denaturierten Eiweiß abfiltriert. Man erhält 280 - 300 ccm einer klaren Lösung, von der 5 - 7 ccm/kg Kaninchen tödlich wirken.

Man füllt nun mit dem 3fachen Volumen Methylalkohol und wäscht in der Zentrifuge 1 x mit Methylalkohol, 1 x mit Azeton und danach 2 x mit Äther. Die Präparate verlieren den Äther bei Zimmertemperatur schnell. Man erhält 1,3 - 1,5 g eines nicht ganz löslichen Trockenpräparates, von dem 100 mg/kg Kaninchen töten." (Ich möchte dieses Präparat als "Roh-Myotoxin" bezeichnen!)

"Man bringt nun 75 ccm physiolog. Kochsalzlösung zum Sieden und trägt 1,5 g des Präparates in die kochende Lösung ein. Man kocht 3 Min., kühlt, zentrifugiert vom Ungelösten ab. Die klare Lösung wird, wie oben beschrieben, mit Methylalkohol, Azeton und Äther gewaschen. Man erhält etwa 1 g Myotoxin, dieses ist leicht löslich in Wasser und kochbeständig. Das so hergestellte Präparat ist sehr hygroskopisch und deshalb nicht unbegrenzt haltbar. Man gibt es deshalb am besten in einen gut evakuierten Exsikkator und schmilzt es anschließend in größeren Portionen ein, wenn möglich im Vakuum. Dabei soll sich möglichst wenig Luftraum über der Substanz befinden. Durch diese bessere Trocknung bleibt das Myotoxin beständiger. Benötigte Mengen sind am Tage der Herstellung der Myotoxinlösung abzuwiegen, wobei all zu langer Luftzutritt zu vermeiden ist. Feuchtes Myotoxin oder Myotoxinlösung ist ebenso wie Frischmuskelextrakt (Muskelfrühgift) unbeständig und inaktiviert sehr rasch.

Die auf diese Weise dargestellten Myotoxinpräparate können sich hinsichtlich ihrer Toxizität unterscheiden. Vermutlich spielt die Qualität des Ausgangsmaterials Trockenmuskel dabei eine Rolle. Mehrere Monate oder Jahre alter Trockenmuskel ergibt weniger aktive Extrakte. Letaldosis: 100 bis ungefähr 30 mg/kg Körpergewicht."

Da anzunehmen ist, daß irgendwelche enzymatischen Vorgänge die Inaktivierung des durch Muskelquetschung entstehenden Frühgiftes hervorrufen, wurde die durch den Fleischwolf zerkleinerte Muskulatur vorsichtshalber in auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühltes Azeton eingebracht, womit diese Vorgänge gehemmt werden sollten.

Um das ganze Verfahren der Herstellung der Trockenmuskulatur etwas zu beschleunigen, wurde die Muskulatur nach den jeweiligen Waschvorgängen in Azeton bzw. Äther nicht mit einem Haarsieb, sondern in einer großflächigen Nutsche sehr schnell getrennt, in dem die Nutsche einer der Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Saugflasche aufsaß. Da der Trockenmuskelextrakt, der durch Ausschütteln in physiolog. Kochsalzlösung gewonnen worden war, extrem

langsam durch Abfiltrieren von gröberen Partikeln zu trennen war, wurde der Extrakt direkt gekocht, wobei sehr viel Eiweiß in groben Klumpen ausfiel, das beim anschließenden Abfiltrieren noch ausgepreßt werden konnte.

c) Herstellung von Myotoxinlösung:

Sollte die Myotoxinlösung zur Injektion verwendet werden, so wurde diese erst dann angesetzt, wenn alles andere für den Versuch bereit war, so daß sie sofort injiziert werden konnte. Die für die in-vitro-Versuche angesetzten Myotoxinlösungen wurden während des Versuches in verschlossenen Reagensgläsern in Eiswasser aufbewahrt. Das Myotoxin wurde für die in-vitro-Versuche in aqua dest. und für die in-vivo-Versuche in physiolog. Kochsalzlösung gelöst. Es zeigt sich, daß das Trockenpulver zwar sehr hygroskopisch, jedoch kurzes Erwärmen des Lösungsmittels bis fast zum Siedepunkt nötig war, um das Gift in Lösung zu bringen.

d) Die Injektion der Myotoxinlösung erfolgte in die Ohrvene der Kaninchen.

e) AMP, ADP, und ATP wurden nach Anweisungen der Fa. Boehringer und Soehne, Mannheim, enzymatisch nachgewiesen. (Herrn Priv. Doz. Dr. med. Jahrmärker sei herzlich für die Bestimmungen der Glykolysemetaboliten in seinem Labor gedankt.) Die Vorschriften hierzu sind aus den von dieser Firma herausgegebenen Heftchen "Biochemica BOEHRINGER" (31) zu entnehmen. Auch wurde hierzu die von Fa. Boehringer hergestellte Testkombination verwendet.

f) Die Elektrophoresen wurden mit der routinemäßig verwendeten Papierelektrophorese, die 14 Stunden läuft, und mit der "Kurzzeit-Membran-Elektrophorese" von Fa. Beckmann, die nur 20 Min. zu laufen hat, durchgeführt.

g) Die Bestimmungen der Elektrolyte,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und anorg. P wurden mit den üblichen Routinemethoden ermittelt.

Für die Freundlichkeit, in ihren Labors die Untersuchungen der Elektrolyte, der Elektrophorese und die Bestimmung der energiereichen Phosphate durchgeführt zu haben, möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Buchborn, Herrn Priv. Doz. Dr. med. Jahrmärker und Herrn Oberarzt Priv. Doz. Dr. med. Knedel meinen verbindlichsten Dank aussprechen. Dieser Dank gilt auch Herrn Priv. Doz. Dr. med. Georgii für die histologische Untersuchung von Gewebsproben durch Myotoxin getöteter Tiere.

B) Bestätigung schon bekannter Befunde

a) Injektion einer letalen Dosis

Einem Kaninchen wurden 200 mg Myotoxin/kg Körpergewicht (5.000 g), in 3 ml physiolog. Kochsalzlösung gelöst, innerhalb von 15" in eine Ohrvene injiziert. Alle nun angegebenen Zeiten beziehen sich auf den Anfang der Injektion.

- 30" Das Tier wird unruhig, Atemfrequenz nimmt zu.
- 1' 15" Das Kaninchen legt sich auf die Seite, Ohren schlaff und kalt. Starke Beteiligung der Flanken beim Atmen, Expirium stoßweise, krampfhaftes Inspirium, Pausen zwischen den Atemexkursionen werden länger.
- 3' 45" Ohren noch schlaff, das Tier kann noch nicht sitzen, sondern liegt schlaff auf der Seite. Auf Berührung, die es sonst mit Fluchtreflexen beantworten würde, reagiert es nicht.
- 5' Nun setzt es sich auf. Die Atmung scheint sich wieder zu normalisieren, putzt sich das Ohr, an dem die Injektion vorgenommen worden ist. Reagiert wieder auf Berührung. Die Ohren sind noch kalt und weder durch Einreiben mit Xylol noch mit heißem Wasser zu hyperämisieren.
- 12' 2. Injektion von rund 140 mg Myotoxin/kg, in 3 ml physiolog. Kochsalzlösung gelöst, innerhalb von 15".
- 12' 20" Krampf der Bauchmuskulatur, krampfhaftes Inspirium, stoßweises Expirium. Ohren werden schlaff, das Tier fällt zur Seite. Atemexkursionen werden krampfhafter und kleiner.

13' Kurze Streckkrämpfe, Laufbewegungen, Tier wälzt sich am Boden. Das Maul ist weit geöffnet, sehr kurzes Inspirium, dann Schnappatmung, kurz aufeinanderfolgend Vocalisation, - Miktion und Defäkation.

13' 30" Atemstillstand

16' Also 2 1/2 Min. nach dem Atemstillstand ist der Herzschlag, nachdem er unregelmäßig geworden ist, durch die Thoraxwand hindurch nicht mehr zu tasten.

#### Sektion:

5 Min. nachdem das Herz durch die Thoraxwand nicht mehr zu tasten war, ist das Tier abgedeckt, Bauch und Thorax sind median eröffnet:

Starke Darmperistaltik und der fibrillierende re. Vorhof fallen auf. Re. Vorhof und re. Kammer prall gefüllt, - li. Vorhof und li. Kammer erscheinen dagegen eingefallen, ja ich möchte sagen, zusammengekrampft. Die Aorta ist völlig blutleer. (Normalerweise verschiebt sich das Blut nach dem Exitus wegen des höheren Druckes im arteriellen Bereich fast völlig auf die venöse Seite.)

Aus Versehen wird der Lunge ein Schnitt von 1/2 cm Länge zugefügt, aus dem sich sofort mit starkem Schwall dunkelrotes, fast schwarz erscheinendes Blut in großer Menge in die Thoraxhöhle ergießt. Nun erscheint das rechte Herz auch nicht mehr so stark gefüllt.

#### Entnahme des Herz-Lungen-Situs:

Herzsektion: Makroskopisch weder rechts noch links irgendwelche Gerinnsel zu finden.

Lungensektion: Weder in den vv. noch in den aa. pulmonales sind Gerinnsel zu sehen. Beim Aufschneiden der

Lunge fällt auf, daß aus den Schnittflächen  
noch Blut sickert.

Entnahme von Gewebeproben aus Herz und Lunge für die histolog.  
Untersuchung (Fixation in Bouin'scher Lösung).

Erst 40' nach dem palpatorisch festgestellten Herzstillstand  
finden sich die ersten weißlich erscheinenden Leichengerinnsel.

Ferner wurde ein Kaninchen mit einem anderen Myotoxinpräparat  
getötet. Hierbei reichten 90 mg/kg zur Tötung. (Die Dosis war  
in 3 ml physiolog. Kochsalzlösung gelöst und wurde innerhalb  
15" injiziert.) Die äußeren Erscheinungen bis zum Eintritt  
des Todes und der Sektionsbefund glichen den oben beschrie-  
benen Beobachtungen. Die Gewebeproben aus Herz und Lunge wur-  
den in einer Lösung mit 4 % Formol und 3 % Sublimat fixiert  
und ebenso wie die anderen Gewebeproben des ersten durch Myo-  
toxin getöteten Kaninchens histolog. untersucht. Folgende  
Färbungen wurden durchgeführt:

- a) H. E.
- b) Fettfärbung
- c) Goldnerfärbung.

Bei Betrachtung der histolog. Schnitte ließen sich in den  
Lungenkapillaren viele Thrombozytenthromben beobachten, -  
Bestätigung der Vermutung, daß bei Ausbleiben einer massiven  
Thrombosierung des Herzens und des kleinen Kreislaufes nach  
Injektion von Myotoxin sich doch eine multiple Mikroemboli-  
sierung in den Lungenkapillaren abspielt.

Bei jenem Tier, welches durch Injektion von 90 mg/kg getötet  
worden ist, war es möglich, vor und direkt nach Injektion  
Blut abzunehmen, so daß die Thrombozyten gezählt werden konnten.

|                        |                                      |
|------------------------|--------------------------------------|
| Vor Injektion:         | 273.600 Thrombozyten/mm <sup>3</sup> |
| direkt nach Injektion: | 4.800 Thrombozyten/mm <sup>3</sup>   |

Bei beiden Kaninchen, die durch Myotoxin getötet worden sind und jenem, welchem eine subletale Dosis gespritzt worden ist, ist vor, während und nach Injektion ein EKG in Extremitätenableitung geschrieben worden. Dabei fanden sich bei allen drei Tieren übereinstimmend eine Verlangsamung der Schlagfolge des Herzens, Arrhythmien, Überleitungsstörungen und Vorhofflimmern.

#### Schlußbetrachtung:

Rein äußerlich ist das Tier an einer Erstickung infolge Atemlähmung gestorben. Hierfür sprechen folgende Befunde:

1. Art der Atmung, Reihenfolge Atemstillstand - Herzstillstand
2. Miktion und Defäkation

#### Innere Befunde:

1. Auffallend starke Darmperistaltik post mortem
2. Starke Blutfülle im kleinen Kreislauf
3. Besonders dunkle Farbe des Blutes. (Mit der Spritze abgenommenes Venenblut von Kaninchen erscheint in der Regel ziemlich hell.)
4. Spätes Auftreten der Leichengerinnsel.

#### b) Injektion einer subletalen Dosis:

Vorgesehen war die Injektion von 60 mg Myotoxin/kg, bei einem Gesamtgewicht von 5.000 g. 300 mg Myotoxin wurden in 3 ml physiolog. Kochsalzlösung gelöst. Ein EKG wurde von den Extremitäten vor und während des Versuches abgeleitet.

- 30" Nach Anfang der Injektion zunächst Beschleunigung der Atemfrequenz, dann Auftreten von Streckkrämpfen, krampfartige Atmung und nun ausgedehntere Pausen zwischen den einzelnen Exkursionen. EKG-Veränderungen im Sinne von Rhythmus- und Überleitungsstörungen. Bei den Krämpfen war die Injektionsnadel aus der Vene geglitten. Bis dahin waren aber erst 60 mg (0,6 ml) injiziert worden.
- 2' Injektion des sich in der Spritze befindlichen Restes an Myotoxin innerhalb von 15". Schon während der Injektion wieder Auftreten von Krämpfen, Kurzatmigkeit, weites Öffnen des Maules, Schnappatmung.
- 2' 30" Atemstillstand, Miktion und Defäkation.
- 2' 45" Herzstillstand für die Dauer von 6 Sek., im EKG Kammerflimmern, dann wieder Einsetzen des Herzschlages, wenn auch mit Rhythmusstörungen, die im weiteren Verlauf verschwinden.
- 2' 50" Einsetzen von Schnappatmung und rückläufig Normalisierung der Atmung. Das Tier liegt noch völlig schlaff und apathisch auf der Seite. Die Ohren sind kalt.
- 10' Allmählich Tonuszunahme, erster Versuch des Tieres, sich aufzurichten, der aber noch mißlingt.
- 15' Das Tier setzt sich auf und beginnt sofort, sich das Ohr zu lecken. Das Tier macht den Eindruck, als sei nichts mit ihm geschehen. Noch einmal Absonderung großer Mengen Harn.
- 45' Die Ohren sind immer noch kalt und nicht durch die üblichen Methoden zu hyperämisieren.

Beobachtung am folgenden Tag: Das Tier ist lebhaft und frißt normal.

Zum Vergleich, wie sehr sich die von mir gemachten Beobachtungen mit denen anderer Autoren decken, sei DYCKERHOFF (33) zitiert:

"Nach Einspritzung der letalen Dosis sitzen die Tiere einen Augenblick ruhig am Boden und atmen schneller als gewöhnlich. Der Kopf dreht sich leicht zur Seite und wird etwas nach rückwärts gebeugt, während ein Löffel schlaff herabhängt. Jetzt weichen die Vorderfüße auseinander, der Körper dreht sich auf die Seite, der Kopf wird noch weiter in den Nacken genommen. Es folgt ein Streckkrampf mit heftigen, oft galoppierenden Laufbewegungen. Die Tiere stoßen mitunter einen Schrei aus. Die Atmung wird ruckartig, wobei sich der Unterkiefer öffnet. Man hat den Eindruck, daß die Tiere ersticken. Die Pausen zwischen den Atemzügen werden länger. Die Laufbewegungen hören auf, die Atmung steht still, während das Herz noch einige Minuten weiterschlägt. Dies alles, bis zum Atemstillstand, spielt sich in 1 - 2 Minuten ab, bei Verwendung größerer Myotoxinmengen entsprechend rascher. Bei nicht tödlichen Mengen ist das erste Zeichen der Erholung ein Erheben des Kopfes, wobei die Schräglage desselben verschwindet. Dann werden die Löffel und der Vorderkörper aufgerichtet. Nach 5 - 10 Min. sieht man diesen Tieren von dem eben Überstandenen fast tödlichen Kollaps nichts mehr an. Die Erholung ist klinisch vollständig."

### C) Laborbefunde:

#### a) Elektrolytbestimmung:

|                  |                                       |
|------------------|---------------------------------------|
| α) des Serums    | } ein und desselben Kaninchens ergab: |
| β) des Myotoxins |                                       |

Serum:  $\text{Na}^+$  = 83 mval/l  
 $\text{K}^+$  = 8,4mval/l  
 $\text{Ca}^{2+}$  = 9,4mval/l

|                         |              |                           |
|-------------------------|--------------|---------------------------|
| Myotoxin: $\text{Na}^+$ | = 44,7mval/l | 18,0 mval/100 mg Myotoxin |
| $\text{K}^+$            | = 5,3mval/l  | 0,22 mval/100 mg Myotoxin |
| $\text{Ca}^{2+}$        | = 4,3mval/l  | 0,15 mval/100 mg Myotoxin |
| Mg                      | = 7,4mval/l  | 0,25 mval/100 mg Myotoxin |

### Ergebnis:

1. In keiner der drei untersuchten Proben ließ sich mit der enzymatischen Bestimmungsmethode AMP finden. (Erst Konzentrationen  $> 0,003 \mu \text{ Mol/ml}$  Lösung AMP sind meßbar.)
2. In allen drei Proben fand sich ADP, wenngleich in verschiedenen Mengen, aber in der gleichen Größenordnung und mit einem etwa physiolog. ATP/ADP-Quotienten.

### Bemerkung:

Zu der Myotoxinprobe von Kaninchen Nr. 30 ist zu sagen, daß die Muskulatur nach ihrer Entnahme aus dem Tier wegen eines technischen Fehlers 15 Min. lang in Azeton liegen mußte, ehe es möglich war, diesen ersten Waschvorgang mit Azeton zur Darstellung der Trockenmuskulatur nach Vorschrift ein zweites Mal zu wiederholen. Von der daraus gewonnenen Myotoxinprobe waren dann auch 340 mg/kg Körpergewicht nötig, um ein Kaninchen zu töten, während von einer anderen Probe Myotoxin 90 mg/kg als Letaldosis genügten.

### D) Thrombozytenagglomeration in vitro unter der Wirkung von Myotoxin sowie Frischmuskelextrakt und Perchlorsäureextrakt aus frischer Muskulatur

#### a) Vorversuche:

Einem Kaninchen wurde unter Vorlegen von 1/10 Natr. citr. (3,8 %ig) Venenblut abgenommen und daraus nach der schon beschriebenen Methode thrombozytenreiches Plasma gewonnen.

1. Frischmuskelextrakt:

0,2 ml eines (nach der in den Versuchsbedingungen A)a) beschriebenen Methode hergestellten) Frischmuskelextraktes wurden zu 0,8 ml thrombozytenreichem Menschen- und Kaninchenplasma gegeben. In beiden Proben fanden sich makroskopisch und mikroskopisch feststellbare Agglomerate.

2. Perchlorsäureextrakt:

0,2 ml eines (im Labor von Priv.Do. Dr. med. Jahrmärker aus frisch entnommener Kaninchenmuskulatur hergestellten) Perchlorsäureextraktes wurden zu 0,8 ml thrombozytenreichem Menschen- und Kaninchenplasma gegeben. Ebenso wie mit Frischmuskelextrakt fanden sich Agglomerate.

3. 1 ml thrombozytenreichem Plasma wurden 100  $\mu$  Rohmyotoxin zugefügt:

Nach 45" fanden sich in der Probe bereits massive Thrombozytenagglomerate, die nach ungefähr 20' begannen, sich wieder aufzulösen.

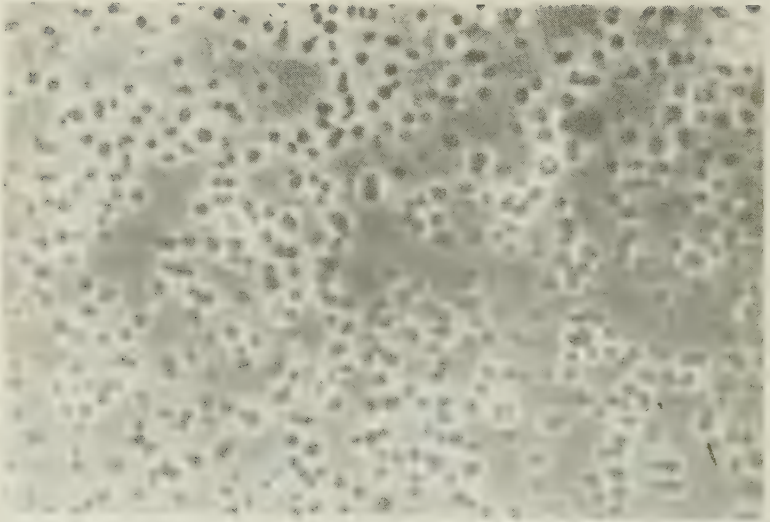
4. Gereinigtes Myotoxin (also die Form, in welcher es auch zur Injektion verwendet worden war) wurde thrombozytenreichem Citratplasma verschiedener Kaninchen in einer Konzentration von 100  $\mu$ /ml zugesetzt. Auch hier fanden sich in allen Proben makroskopisch gut sichtbare Agglomerate, die, als seien sie durch reines ADP hervorgerufen, nach einer Zeit von 20 - 50' wieder verschwanden. Derselbe Befund ließ sich bei Verwendung von Myotoxinproben verschiedener Tiere erheben.

5. Durch Zugabe von 100  $\mu$  Myotoxin zu 1 ml thrombozytenreichem Menschenplasma (1/10 Citrat) ließen sich auch

Agglomerate hervorrufen, wenngleich diese unter dem Mikroskop nicht so groß erschienen wie bei Kaninchen-thrombozyten.

Siehe Fotos Seite 90 - 92!

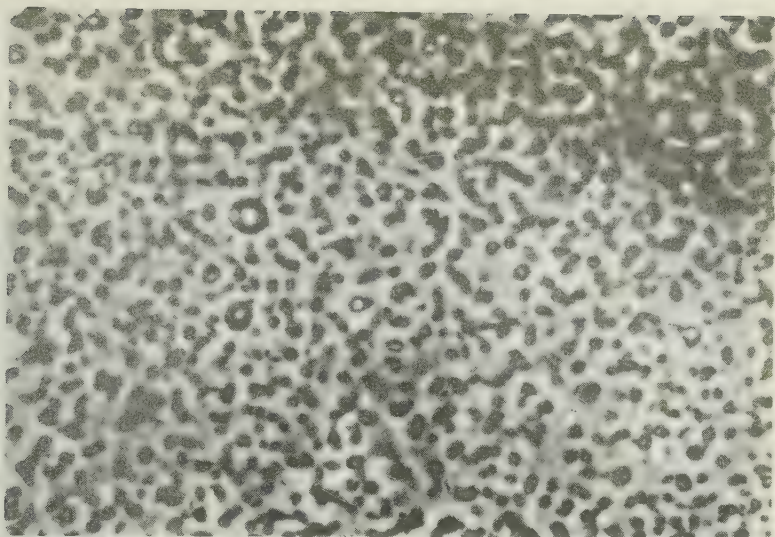
Diese Bilder wurden mit Objektiv PH 16 und Okular 10 photographiert.



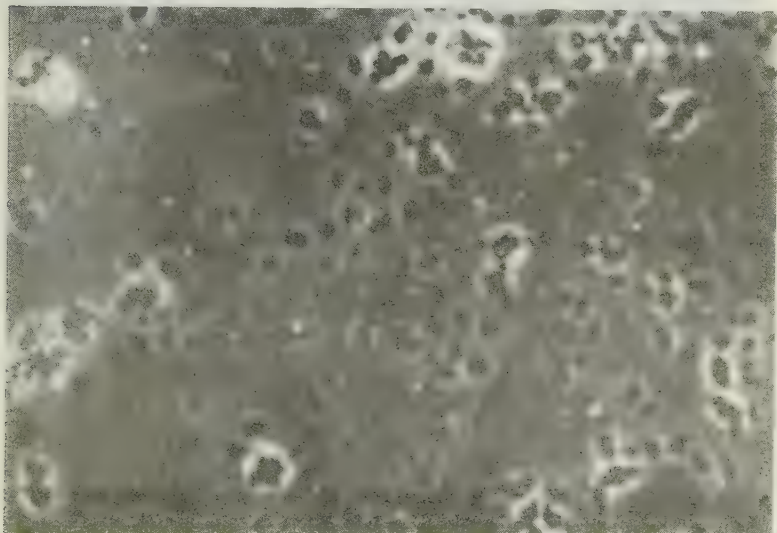
Menschenthrombozyten + physiolog. Fackl-Lösung (= Leerwert)



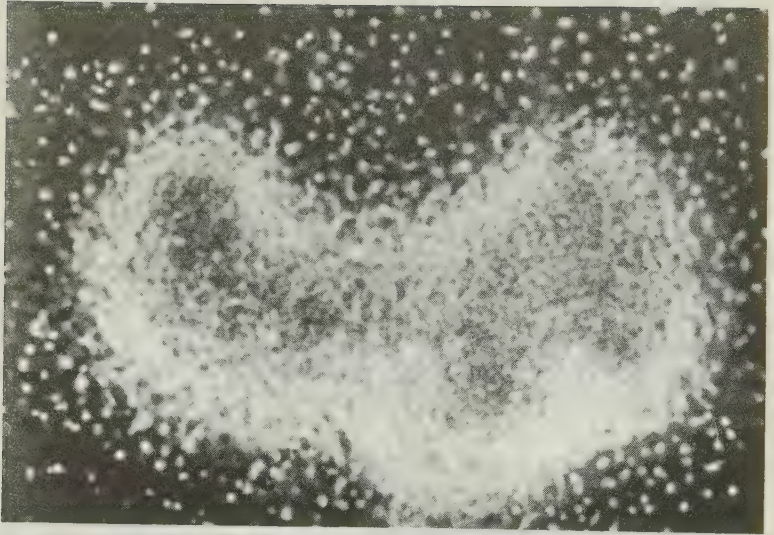
Menschenthrombozyten + 100  $\gamma$  Myotoxin/ml Agglomerate



Kaninchenthrombozyten + physiolog. NaCl-Lösung (= Leerwert)



Kaninchenthrombozyten + 100  $\mu$ g Myotoxin/ml Agglomerate



Kaninchenthrombozyten + 100  $\mu$  Myotoxin/ml Riesenagglomerate

b) Elektrophorese von Serum und Myotoxin ein und desselben Tieres:

Vor Tötung des Tieres ist ihm Blut abgenommen worden zur Bereitung des Serums.

Vergleicht man sowohl die Auswertungskurven als auch die Elektrophoresen selbst von Serum und Myotoxin miteinander, so stellt man fest, daß sich beim Myotoxin hauptsächlich eine Fraktion zeigt, die, verglichen mit der Serumelektrophorese zwischen  $\beta$  und  $\gamma$  liegt und wahrscheinlich ein Muskelprotein darstellt.

Die Kurzzeit-Membran-Elektrophorese, die sofort nach Herstellung der Myotoxinlösung in Gang gesetzt worden ist, und nur 20 Min. lang lief, zeigt im Unterschied zur Papierelektrophorese deutlich noch eine Fraktion in Höhe der  $\gamma$ -Globuline der Serumelektrophorese.

Quantitative Auswertung der Papierelektrophorese:

|                     | <u>Serum</u> | <u>Myotoxin</u> |
|---------------------|--------------|-----------------|
| <u>Gesamteiweiß</u> | 4,995 g%     | 0,99 g%         |
| Albumine            | 53,5 %       | ---             |
| Globuline:          |              |                 |
| alpha <sub>1</sub>  | 5,5 %        | ---             |
| alpha <sub>2</sub>  | 7,6 %        | ---             |
| beta                | 7,9 %        | ---             |
| gamma               | 25,5 %       | 0,47 %          |

c) Enzymatische Bestimmung (Labor Dr. Jahrmarker) von AMP, ADP und ATP aus Myotoxinproben, die von verschiedenen Tieren gewonnen worden waren:

|              |                                                               |                 |
|--------------|---------------------------------------------------------------|-----------------|
| Kaninchen 30 | ATP 3,80 $\mu$ Mol/ml Lösung = 10,80 $\mu$ Mol/100mg Myotoxin |                 |
|              | ADP 0,53                                                      | 1,51            |
|              | AMP 0 bzw. $< 0,003$                                          | 0 bzw. $< 0,01$ |
|              | anorg.P 4,89                                                  | 14,0            |
| Kaninchen 2  | ATP 2,58                                                      | 7,40            |
|              | ADP 0,442                                                     | 1,26            |
|              | AMP 0 bzw. $< 0,003$                                          | 0 bzw. $< 0,01$ |
|              | anorg.P 13,2                                                  | 37,8            |
| Kaninchen 44 | ATP 2,57                                                      | 7,35            |
|              | ADP 0,435                                                     | 1,24            |
|              | AMP 0 bzw. $< 0,003$                                          | 0 bzw. $< 0,01$ |
|              | anorg.P 9,53                                                  | 27,2            |

d) Qualitativer und quantitativer Nachweis:

Einem Kaninchen wurde 1/10 Sequestren (1 %ig) und 1/10 Citratblut entnommen und daraus thrombozytenreiches Plasma hergestellt.

Nun wurde das Myotoxin in verschiedenen Dosen sowohl dem Citrat, als auch dem Sequestrenplasma zugesetzt. Die Proben wurden in analoger Weise unter dem Mikroskop betrachtet und beurteilt, wie das schon bei den Versuchen mit Heparinoid-Geigy, Heparin Novo und Elaparon geschehen ist.

|             | <u>Citratplasma</u> | <u>Sequestrenplasma</u> |
|-------------|---------------------|-------------------------|
| NaCl Plasma | Ø                   | Ø                       |
| 0,1 µ/ml    | (+)                 | Ø                       |
| 0,5 µ/ml    | +                   | Ø                       |
| 0,8 µ/ml    | +                   | Ø                       |
| 1,0 µ/ml    | + (+)               | Ø                       |
| 5,0 µ/ml    | + (+)               | Ø                       |
| 8,0 µ/ml    | + +                 | Ø                       |
| 10,0 µ/ml   | + +                 | Ø                       |
| 100,0 µ/ml  | + + +               | Ø                       |

Bemerkung zur Auszählung der Thrombozyten:

Den angesetzten Proben wurden 5 Min., nachdem sie mit Myo-  
toxin beschickt worden waren, mit Leukozytenzählpipetten  
Proben zur Auszählung entnommen.

|             | <u>Citratplasma</u> | <u>Sequestrenplasma</u> |
|-------------|---------------------|-------------------------|
| NaCl Plasma | 595.000             |                         |
| 100,0 µ/ml  | 278.400             |                         |
| 10,0 µ/ml   | 307.200             |                         |
| 8,0 µ/ml    | 352.800             |                         |
| 5,0 µ/ml    | 372.000             | nirgends Agglomerate!   |
| 1,0 µ/ml    | 405.600             |                         |
| 0,8 µ/ml    | 406.000             |                         |
| 0,5 µ/ml    | 432.000             |                         |
| 0,1 µ/ml    | 458.400             |                         |

### Ergebnisse:

1. Selbst in einer Dosierung von nur noch  $0,1 \mu$ /ml thrombozytenreichen Plasmas, vermochte dieses Myotoxinpräparat noch Agglomerate hervorzurufen.
2. Auch in diesen Versuchen zeigte sich wieder eine Abhängigkeit der Agglomerationstendenz der Thrombozyten von der Konzentration der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.
3. Da gefunden worden ist, daß sich im Myotoxin ADP und ATP befinden, ist als sicher anzunehmen, daß die durch Myotoxin hervorgerufenen Thrombozytenagglomerate durch den Gehalt vor allem an ADP und zum geringeren Anteil von ATP hervorgerufen worden sind. Es kann durchaus vermutet werden, daß ATP eventuell dadurch indirekt wirkt, daß es durch ATPase zunächst in ADP umgewandelt wird, welches dann in starkem Maße agglomerierend wirkt.

### Bemerkung:

Während der vorangegangenen Versuche wurde das Myotoxin zunächst im Eisbad aufbewahrt. 1 Std. nach Ansetzen der Lösung wurden noch einmal  $100 \mu$  Myotoxin zu thrombozytenreichem Plasma gegeben: Der Agglomerationseffekt war makroskopisch derselbe wie zu Anfang des Versuches.

### Zählergebnisse hierzu:

|                                            |                                     |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|
| Leerwert                                   | 260.000 Thrombozyten/ $\text{mm}^3$ |
| Myotoxin direkt nach Auflösen desselben in |                                     |
| NaCl, $100 \mu$ /ml                        | 117.600 Thrombozyten/ $\text{mm}^3$ |
| Myotoxin, 1 Std. im Eisbad $100 \mu$ /ml   | 146.000 Thrombozyten/ $\text{mm}^3$ |

E) Intravenöse Injektion von ADP, ATP und Kombination von ADP und ATP beim Kaninchen

1. Injektion von 3,0 mg ADP/kg Körpergewicht

In diesem, wie auch in den folgenden Versuchen wurde die entsprechende Menge ADP, ATP sowie ADP+ATP jeweils in 3 ml physiolog. NaCl-Lösung gelöst und innerhalb von 5 " gespritzt.

Zählergebnisse:

|                       | <u>1. Kaninchen</u> | <u>2. Kaninchen</u> |                 |
|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
|                       | Tz./mm <sup>3</sup> | Tz./mm <sup>3</sup> |                 |
| vor Injektion         | 300.000             | 319.200             |                 |
| sofort nach Injektion | 297.600             | 168.000             | } kaum<br>Aggl. |
| 5' p. J.              | 81.600              | 290.400             |                 |
| 10' p. J.             | 180.000             | 291.500             |                 |
| 30' p. J.             | 220.800             | ---                 |                 |

(Tz. = Thrombozyten  
Aggl. = Agglomerate  
p. J. = post injectionem )

Bei keinem der beiden Tiere waren äußerlich irgendwelche Erscheinungen festzustellen.

2. Injektion von 20,0 mg ATP/kg Körpergewicht

Zählergebnisse:

|                       | <u>1. Kaninchen</u> | <u>2. Kaninchen</u> |
|-----------------------|---------------------|---------------------|
| Vor Injektion         | 273.600             | 333.600             |
| sofort nach Injektion | 249.600             | 333.600             |
| 5' nach Injektion     | 288.000             | 330.000             |
| 10' nach Injektion    | 290.400             | 331.200             |
| 30' nach Injektion    | 280.800             | ---                 |

Bei beiden Tieren machte sich sofort nach Injektion eine starke motorische Unruhe mit leichter Verringerung der Atemexkursionen bemerkbar.

3. Injektion von 3,0 mg ADP/kg + 20,0 mg ATP/kg Körpergewicht

Zählergebnisse:

|                       | <u>1. Kaninchen</u>                                        | <u>2. Kaninchen</u> |
|-----------------------|------------------------------------------------------------|---------------------|
| Vor Injektion         | 268.800                                                    | 345.600             |
| sofort nach Injektion | Abnahme nicht möglich, da die Venen völlig kollabiert sind |                     |
| 5' nach Injektion     | 240.000                                                    | 242.000             |
| 10' nach Injektion    | 252.000                                                    | 256.800             |

Auch diese beiden Tiere glichen sich in ihrer Reaktion auf die Injektion sehr stark: Schon während der Injektion bekamen sie Streckkrämpfe, die ca. 30" anhielten, dann fielen die Kaninchen schlaff zur Seite. Zunächst war eine Vertiefung der Atemexkursionen und dann ein ähnliches Atmen wie unter der Wirkung von Myotoxin zu beobachten. Wie aus der obigen Tabelle schon hervorgeht, konnte die Blutentnahme direkt im Anschluß an die

Injektion aus einer Ohrvene des kontralateralen Ohres nicht erfolgen, da die Venen völlig kollabiert waren. Erst 5' p. J. ließ sich Blut entnehmen, wobei die Venen immer noch sehr leicht kollabierten.

Nach 9 - 10 Min. kamen die Tiere wieder zu sich, die bis dahin schwer atmend, mit Pausen zwischen den einzelnen Atembewegungen, die die physiolog. Dauer weit überschritten, schlaff dagelegen waren, und setzten sich auf. Ca. 15 Min. nach Injektion war die Atmung wieder normal. Man sah ihnen nicht mehr an, daß sie noch kurze Zeit vorher in ihrem Allgemeinbefinden erheblich gestört gewesen sind.

4. Weiteren zwei Kaninchen wurden 30,0 mg ADP/kg Körpergewicht (in 3 ml physiolog. Kochsalzlösung gelöst) innerhalb von 5" injiziert.

#### Ergebnis:

1. Eines der Tiere vertrug die Injektion ohne auffallende äußere Erscheinungen.
2. Das zweite Kaninchen wurde schon wenige Sekunden nach Beendigung der Injektion dyspnoisch, machte nach einer Minute noch einen Satz nach Vorne und fiel tot um. Eine sofort durchgeführte Sektion ergab makroskopisch keine Embolisierung des Herzens und des kleinen Kreislaufes. Subpleural (pleura visceralis) fanden sich jedoch deutlich sichtbare, linsengroße, petechiale Blutungen!
3. Außerordentlich beachtenswert erscheint wieder die individuelle Empfindlichkeit der Tiere auf die intra-venöse Injektion von gleichen Mengen ADP.

IX.

Diskussion

Die Elektrophorese von Myotoxin, verglichen mit der Serum-elektrophorese desjenigen Tieres, aus welchem das Myotoxin gewonnen worden war, zeigte eine Eiweißfraktion, von der man annehmen kann, (auf Grund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit verglichen mit den Fraktionen der Serumelektrophorese), daß es sich dabei um ein hitzedenaturiertes Muskeleiweiß handelte. Ob dieser Eiweißfraktion toxische Wirkung zukommt, ließ sich mit den mir zur Verfügung stehenden Methoden nicht ohne weiteres feststellen.

Die Ergebnisse der Elektrolytbestimmungen lassen erkennen, daß mit den gefundenen Konzentrationen der einzelnen Elektrolyte kaum toxische Wirkungen hervorzurufen sind.

Wie an sich zu erwarten gewesen ist, fand sich bei der enzymatischen Untersuchung einiger Myotoxinproben ADP und ATP und praktischen kein AMP. Es konnte allerdings nicht festgestellt werden, ob dem im Myotoxin enthaltenen, noch nicht genau definierten Eiweiß irgendwelche agglomerationsfördernde oder -hemmende Wirkungen zukommen; jedoch erscheint es mir als sicher, daß auch das im Myotoxin enthaltende ADP Thrombozytenagglomeration hervorzurufen, imstande ist. Wie schon seit einiger Zeit bekannt ist (13), und durch meine eigenen Versuche bestätigt, vermag reines ADP Menschen- und Kaninchenthrombozyten in Citratplasma zu agglomerieren.

BORN (13) hat einen geringfügigen Antagonismus zwischen ADP und ATP in vitro mit Menschenthrombozyten (bei Verwendung gleicher Mengen von ADP und ATP) in Bezug auf die Thrombozytenagglomeration festgestellt:

ATP soll das Ausmaß der Thrombozytenagglomeration hemmen und außerdem die Wiederauflösung derselben fördern. In mehreren

Versuchen konnte ich jedoch eine geringfügige Thrombozytenagglomeration unter der Wirkung von ATP feststellen. Nach HELLEM (12) muß jedoch der agglomerationsfördernde Effekt von ATP vorsichtig beurteilt werden, da eine Verunreinigung des verwendeten ATP-Präparates mit ADP diese Erscheinung kausal verfälschen kann: Jene ATP-Präparate, welche in den Versuchen von HELLEM Thrombozytenagglomerationen hervorge-rufen hatten, wurden papierelektrophoretisch untersucht, wobei sich geringe Mengen ADP tatsächlich fanden und gleichzeitig vom ATP abgetrennt wurden. Das so gereinigte ATP vermochte nunmehr keine Thrombozytenagglomeration mehr hervor-zurufen. Daraus schloß HELLEM, daß gleichzeitiges Vorhanden-sein von ATP in thrombozytenreichem Plasma die agglomera-tionsfördernde Wirkung von ADP zumindest nicht hemmt. Da bekannt ist (11), daß ATP im Plasma durch die Hexokinase-reaktion in ADP umgewandelt wird, ist sogar zu erwarten, daß das ATP, wenngleich auch erst über den Abbau in ADP, agglomerationsfördernd wirken kann; eine Überlegung, die mit den entsprechenden von mir durchgeführten in-vitro-Versuchen durchaus in Einklang steht.

(Wie wenig man sich bisher noch über die Wirkung von ATP und die Beziehungen zwischen ATP und ADP auf die Thrombo-zytenagglomeration einig ist, sei durch folgendes angedeutet: O'BRIEN (34) hat gefunden, daß " die Agglomeration, durch ADP und andere Substanzen, vermindert o d e r nicht be-einflußt wurde, gab man vor ADP dem Plasma ATP zu". SPAET und CINTRON (35) schreiben dagegen, daß aufgrund ihrer Un-tersuchungen "die Möglichkeit einer Thrombozytenagglomera-tion unter entsprechenden Bedingungen zu erwägen sei, ob-wohl GAARDER und Mitarbeiter (36) negative Ergebnisse mit ATP erhalten hatten. Wahrscheinlich sei ATP in geringem Maße aktiv, - dies allerdings nur bei Vorhandensein ent-sprechender Mengen Ca oder Mg."

Im Gegenteil: Reines ATP ruft in geringem Maße sogar Thrombozytenagglomerate hervor. Ein eventuell stärkerer agglomerationsfördernder Effekt eines ATP-Präparates muß nach Angaben von HELLEM (12) vorsichtig beurteilt werden, da solche Präparate oft mit ADP verunreinigt sind. Was den agglomerationsfördernden Effekt von ADP hemmen könnte, wäre AMP; davon wurde aber, wie gesagt, praktisch nichts gefunden.

Die Behauptung früherer Autoren (2, 6), daß eine Myotoxinlösung durch Stehen sehr schnell an Toxizität verliert, ließ sich aus methodischen Gründen nicht nachprüfen. Als Kriterium für das Maß der Toxizität würde nach dem jetzigen Stand der Untersuchungen immer noch gelten, daß ein Tier mit einer bestimmten Dosis Myotoxin gerade getötet werden kann. (Dieser Grenzwert müßte durch wiederholte Injektion mit steigenden Dosen ermittelt werden. Dem stellt sich aber entgegen, daß mit jeder Injektion dem Tier körperfremdes Eiweiß verabreicht wird, so daß ungewiß ist, inwieweit die Reaktion des Tieres auf die folgende Injektion durch allergische Vorgänge in dem durch die vorangegangene Einspritzung sensibilisierten Körper beeinflußt werden) Könnte man diesen Sensibilisierungseffekt irgendwie ausschalten, oder träte er entgegen den theoretischen Überlegungen im Experiment nicht auf, und hätten beispielsweise 90 mg/kg Körpergewicht eines Myotoxinpräparates direkt nach seiner Auflösung ein Tier getötet, müßte man natürlich für die Injektion eines Myotoxinpräparates, welches eine Stunde gestanden hat, ein neues Tier verwenden. Selbst bei Anwendung gleicher Myotoxinmengen und gleicher Injektionsgeschwindigkeit des Präparates, kennt man nicht die individuelle Empfindlichkeit des Kaninchens gegenüber dem Gift. Zu diesem Zwecke wären aus dem gleichen Wurf stammende, unter den gleichen Bedingungen gehaltene, möglichst gleichgewichtige Inzuchttiere zu verwenden, von denen man erwarten könnte, daß sie einigermaßen gleich reagieren würden.

Nachdem in vitro die thrombozytenagglomerierende Wirkung von Frischmuskel- und Perchlorsäureextrakt (aus frisch entnommener Muskulatur) auf Menschen- und Kaninchenthrombozyten beobachtet wurde, ließ sich bei den in-vitro-Ver suchen über den Einfluß des Myotoxins auf die Thrombozytenagglomeration eindeutig feststellen, daß Myotoxinlösung, läßt man sie beispielsweise eine Stunde in Eiswasser stehen, auch nach dieser Stunde praktisch noch denselben agglomerationsfördernden Effekt aufweist, wie direkt nach Ansetzen der Lösung. Sollte die Toxizität von Myotoxinlösung tatsächlich durch Stehen abnehmen, so wäre die Abnahme der Toxizität sehr wahrscheinlich nicht auf die Abnahme der Konzentration an ADP zurückzuführen, da der Agglomerationseffekt der gleiche bleibt.

Dass Myotoxin tatsächlich ein Toxin ist, konnte ich dadurch bestätigen, daß Kaninchen damit getötet oder durch Applikation geringerer Dosen, zumindest temporär, in ihrem körperlichen Wohlbefinden sehr beeinträchtigt wurden. Meine dabei gemachten Beobachtungen über die Art, wie die Tiere starben und der Sektionsbefund, stimmten mit den von früheren Autoren (33) durchaus überein. Die Dosen, die aufgewendet worden waren, um ein Tier zu töten, können jedoch nicht als absolut geltendes Maß aufgefaßt werden. Am Schluß seiner Herstellungsanleitung für Myotoxin gibt GOOSENS für die Letaldosis (30 - 100 mg/kg) an. Bei meinen Versuchen reichten z. B. einmal alleine schon 60 mg bei einem 5 kg schweren Tier aus, (also 12 mg/kg!), um schon ganz erhebliche Störungen hervorzurufen. Ein anderes Mal mußten 340 mg/kg injiziert werden, in einem anderen Fall nur 90 mg/kg, um ein Tier zu töten. Dabei waren auch drei verschiedene Myotoxinproben verwendet worden. Ich glaube nicht, wie vorher schon einmal erwähnt, daß diese Schwankungen in der Wirksamkeit der einzelnen Myotoxinpräparate nur von dem Gehalt an giftig wirkenden Stoffen abhängig ist, sondern auch von der Reaktionsbereitschaft des Einzelindividuums auf dieses Gift, sowie von der

Geschwindigkeit, mit der das Myotoxin in den Körper eingebracht wird.

Da in vitro festgestellt worden ist, daß sich in Myotoxin ADP und ATP befinden, und daß Thrombozyten unter der Wirkung von Myotoxin agglomerieren, lag die Vermutung nahe, daß ADP und ATP an dem in vivo toxisch wirkenden System zumindest beteiligt sind (Interessant ist, daß diese Vermutung auch schon KÖNIG (4) äußerte, dabei aber noch weniger über die Eigenschaften von ADP und ATP informiert war, - er sprach ja allgemein nur von der "giftigen Adenosinphosphorsäure" -, als man es jetzt im Hinblick auf deren Rolle im toxischen System des Myotoxins ist.)

Die Beobachtung der Tiere gab Anlaß zur Vermutung, daß sie erstickt waren. Zwar konnten makroskopisch bei der Sektion keine Thromben gefunden werden, jedoch bestand noch die Möglichkeit, daß die Tiere an einer multiplen Mikroembolisierung in Form von Thrombozytenagglomeraten mit nachfolgender Atemlähmung zugrunde gegangen sind. Die Agglomerate können in-vivo durch ADP hervorgerufen werden, wie BORN (13), NORDÖY und CHANDLER (15) bei Kaninchen und Ratten hinreichend gezeigt haben. Die Frage, welche Rolle dabei das ATP gespielt haben könnte, kann nur, da noch nicht genau geklärt ist, welchen Einfluß es nun auf die Körperzellen hat, mit der Vermutung beantwortet werden, daß es durch ATPase abgebaut wird und so letzten Endes als ADP wirkt. (Es wäre auch an eine direkte Wirkung des ATP's auf die Zellpermeabilität des Atemzentrums zu denken in Form von Lähmung desselben oder zumindest Beeinträchtigung seines Funktionszustandes. Diese Beeinträchtigung könnte dann noch eine Verstärkung durch Hypoxie erfahren infolge der Versorgung des Zentrums mit nur mangelhaft arterialisiertem Blut, durch die angenommenen Thrombozytenmikroemboli.) Diese Vermutungen, daß sich in den Lungenkapillaren aus Thrombozyten bestehende Mikroemboli befinden, konnten histologisch bestätigt werden!

Auch fielen die Zählergebnisse der Versuche über die Injektion von ADP, ATP und ADP + ATP etwas erstaunlich aus, verglichen mit den dabei gemachten Beobachtungen über das Verhalten der Tiere auf die Injektion hin. So zeigten die Tiere, denen nur 3,0 mg/kg Körpergewicht ADP gespritzt worden war, äußerlich nichts; ihre Thrombozyten nahmen jedoch nach Injektion ab, wenngleich sich bei der Auszählung Agglomerate zeigten, von denen man nicht wußte, ob sie in vivo oder in vitro entstanden waren; hätte dann eigentlich auch bei jenen Tieren eine ähnlich starke Abnahme der Thrombozyten nach Injektion von ADP + ATP stattfinden müssen, was sich jedoch zählerisch nicht erwiesen hat. Individuelle Empfindlichkeit des einzelnen Tieres, die man dafür als Erklärung anführen könnte, scheint hierbei keine allzu große Rolle gespielt zu haben, da der Effekt bei beiden Tieren tatsächlich qualitativ fast der gleiche gewesen ist. Dafür zeigten aber jene Kaninchen, welchen ATP alleine gespritzt worden war, so gut wie keine Abnahme der Thrombozyten nach Injektion, - dafür aber äußerlich Zeichen, die auf eine Erschwerung der Atmung hindeuteten. Da eine Beeinträchtigung der Atmung sowohl peripher (durch Embolie) als auch zentral (toxische Schädigung) erfolgen kann, bei alleiniger Injektion von ATP keine Abnahme, ja sogar z. . . erstaunliche Übereinstimmung der Zählergebnisse untereinander vorlag, sprechen die dabei gemachten Beobachtungen des äußeren Verhaltens der Versuchstiere für irgendwelche zentralen Vorgänge, über deren Natur nichts weiter ausgesagt werden kann.

(Durch in-vitro-Versuche ist auch nachgewiesen worden, daß sich weder Erythrozyten noch Leukozyten unter der Wirkung von Myotoxin zusammenballen. Auch konnte in vitro keine Steigerung der Gerinnbarkeit des Blutes festgestellt werden. Inwieweit die in-vitro-Vorgänge auf die Abläufe in vivo übertragbar sind, muß auch hier, wie sonst allgemein dahingestellt sein.)

Falls man also für das ATP eine vorwiegend zentrale Wirkung annimmt, in Form einer Minderung des Funktionszustandes des Atemzentrums, für das ADP eine vorwiegend periphere Wirkung (Thrombozytenagglomeration-->Verstopfung der Lungenkapillaren) wäre verständlich, warum die Tiere, welchen ADP + ATP injiziert worden ist, noch stärkere Erscheinungen gezeigt haben, welche denen nach Myotoxininjektion sehr ähnlich waren.

NORDÖY und CHANDLER (15) hatten ähnliche Versuche mit ADP an Ratten durchgeführt: Sie spritzten ADP-Lösungen in die v. cava caud. Dabei wurden die Mengen an ADP, die Dauer der Injektion und die Zeitspanne zwischen der Beendigung der Injektion und der Tötung der Tiere variiert. Nach Tötung erfolgte sofort die Entnahme von Gewebeproben u. a. aus der Lunge. Bei Anwendung von 70 mg/kg, Injektion der Dosis innerhalb von 2" und Tötung des Tieres 20" nach Beendigung der Injektion, fanden sich in den Lungenkapillaren und -arteriolen massive Thrombozytenagglomerate, (die sie mit der PTAH-Färbung nach Mallory im histologischen Schnitt nachwiesen.). Wurde dieselbe Dosis wiederum innerhalb von 2" gespritzt, aber erst 60" nach Beendigung der Injektion das Tier getötet, fanden sich schon auffallend weniger Agglomerate im histologischen Präparat. Wurde die Dosis innerhalb von 60" ! gespritzt, und das Tier 20" später getötet, fanden sich auch noch Agglomerate. An äußeren Erscheinungen registrierten die genannten Autoren bei schneller Injektion fast regelmäßig Atemstillstand, der z. T. nur kurz dauerte, in einigen Fällen auch bestehen blieb, während dessen das Herz noch einige Zeit weiterschlug. Bei langsamer Injektion traten kaum Veränderungen der Atmung, wohl aber noch Agglomerate in den Lungengefäßen auf.

Von einer intravenösen Injektion mit ADP an einem Kaninchen, welches eine Minute nach Injektion verstarb, wurde in dieser Arbeit berichtet.

Falls es überhaupt erlaubt ist, aus den Ergebnissen, die mit Ratten gezeitigt worden sind, Analogieschlüsse auf Kaninchen zu ziehen, kann folgendes gesagt werden:

Da Kaninchenthrombozyten in vitro sowohl durch ADP als auch mit Myotoxin zur Agglomeration veranlaßt werden können, kann erwartet werden, daß diese Thrombozytenagglomeration auch in vivo durch das im Myotoxin vorhandene ADP hervorgerufen wird.

Histologisch ließen sich auch tatsächlich Thrombozytenagglomerate in den Lungenkapillaren eines durch Myotoxin getöteten Tieres nachweisen.

X.

Zusammenfassung:

1. Schon bestehende Befunde

- a) über die agglomerationsfördernde Wirkung von ADP auf Menschen- und Kaninchenthrombozyten,
- b) über den agglomerationsverzögernden und den die Auflösung der Agglomerate beschleunigenden Effekt von Adenosin und AMP bei gleichzeitigem Vorhandensein von ADP konnten durch zahlreiche Versuche mit Menschen- und Kaninchenplasma bestätigt werden.

2. Bei der Frage, ob Antikoagulantien vom Typ des Heparins bzw. der Heparinoide die agglomerationsfördernde Wirkung von ADP zu verhindern vermögen, fand sich bei den untersuchten Substanzen mehr oder weniger stark ausgeprägt das Gegenteil: z. B. vermag Heparinoid-Geigy in vitro Kaninchenthrombozyten zu agglomerieren. Daß Heparinoid-Geigy bei manchen Kaninchen sogar in vivo Thrombozytenagglomeration hervorruft, konnte auch belegt werden.

3. Eine Abhängigkeit der Thrombozytenagglomeration unter der Wirkung von ADP und Heparinoid-Geigy von der Konzentration der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist bewiesen. Es konnte ferner gezeigt werden, daß die Thrombozytenagglomeration unter der Wirkung von ADP nicht nur von der Konzentration freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, sondern auch vom Vorhandensein eines oder mehrerer Plasmafaktoren abhängig ist.

4. Die Frage, ob die Thrombozytenagglomeration unter der Wirkung von Heparinoid-Geigy über die Freisetzung von ADP verläuft, konnte zwar nicht beantwortet werden, jedoch

wurde beim Versuch der Beantwortung dieser Frage in Ammoniumsulfat (3,8 molar, ph ca. 6) eine Substanz gefunden, die (durch ADP oder Heparinoid-Geigy hervorgerufene) Agglomerate so gut wie vollständig aufzulösen und die Agglomeration durch ADP oder Heparinoid-Geigy fast ganz zu verhindern vermag.

5. a) Daß Myotoxin durch intravenöse Injektion bei Kaninchen in entsprechenden Dosen tödlich wirkt, konnte bestätigt werden. Außerdem stehen meine Beobachtungen über das Verhalten der Tiere nach Injektion und die Sektionsbefunde in vollem Einklang mit den früher schon erhobenen Befunden.
  - b) Neu an meinen weiteren Untersuchungen war das Ergebnis enzymatischer Tests mit Myotoxin auf dessen Gehalt an Glykolysemetaboliten: ADP und ATP wurden als Bestandteil von Myotoxin gefunden.
  - c) Nachdem enzymatisch das Vorkommen von ADP und ATP im Myotoxin festgestellt worden war, konnte man sich auch die agglomerationsfördernde Wirkung von Myotoxin auf Menschen- und Kanincenthrombozyten in vitro erklären. Daraus entstand die Vermutung, daß das Myotoxin auch in vivo Thrombozytenagglomerate hervorruft, welche die Lungenkapillaren zeitweilig verstopfen, was, je nach Ausmaß der Verstopfung der Gefäße, zur Erstickung führte. Histologisch konnte die Vermutung bestätigt werden.
- Vielleicht ließe sich der von früheren Autoren (1, 4) erwähnte kreislaufdepressorische Effekt des Myotoxins über den Lungenentlastungsreflex nach Schwiegle erklären.

- d) Ferner konnte festgestellt werden, daß Injektion von ADP und ATP in derjenigen Konzentration, wie sie in einer bei einem anderen Tier verabfolgten letalen Myotoxinmenge vorhanden gewesen ist, bei den Versuchstieren Symptome zeitigte, die denen nach Myotoxininjektion stark ähnelten.
- e) Die Umwandlung von ATP in ADP durch ATPase, damit sekundär gleichsinnige Wirkungsweise von ATP wie ADP und die direkte Wirkung von ATP auf die Zellen des ZNS wurden diskutiert.

Herrn Prof.Dr.med.H.SCHWIEGK danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und für die Möglichkeit, daß ich an der unter seiner Leitung stehenden I.Medizinischen Universitätsklinik, die für diese Arbeit notwendigen Experimente ausführen durfte.

Herrn Prof.Dr.med.R.MARK danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die liebenswürdige Unterstützung, mit der er mit stets bei allen Schwierigkeiten meiner Arbeit zur Seite stand.

Frau A.MEISNER , die mich in der zu den Experimenten nötigen Labortechnik unterwies und bei der Ausführung der Experimente immer freundlichen Rat erteilte, sei auch mein verbindlichster Dank ausgesprochen.

XI.

Literaturverzeichnis

1. Freund H. "Über die Entstehung von Giften  
im Blut"  
Med. Klinik, 17, 437, 1920
2. Lenggenhager K. "Die Entlarvung der Frühgifte"  
Mitteilungen aus den Grenzgebieten  
der Medizin und Chirurgie,  
44, 175, 1935 - 1937
3. Marx R. Mündliche Mitteilungen, 1964
4. König W. "Schock und Kollaps"  
Der Chirurg, 2, 41, 1934
5. Zipf K. "Über die pharmakologische Wirkung  
Wagenfeld F. frisch defibrinierten Blutes"  
Archiv f. exp.Path., 150, 70 u. 92,  
1930
6. Dyckerhoff H. "Über die Beziehungen zwischen  
Schörcher F. den 'Frühgiften' und den Kompo-  
nenten des Blutgerinnungssystems",  
Biochem. Zeitschrift, 300, 193, 1939
7. Dyckerhoff H. "Über Blutzerfallsgifte und ihre  
Marx R. Bedeutung für Bluttransfusion und  
Blutkonservierung",  
Zeitschrift f. exp.Med., 363, 108, 1941
8. Dyckerhoff H. "Über das toxische System der  
Muskelzellen (Myotoxin)",  
Beiträge zur path. Anatomie,  
103, 245, 1939

9. Müller-Seifert "Taschenbuch d. Med.-Klin.  
Diagnostik",  
Verlag J. F. Bergmann, München 1962,  
S. 456
10. Goosens N. "Zur Frage eines Einflusses des  
Gastpar H. Roßkastanienextraktes 'Venostasin'  
auf die Blutgerinnung",  
Med. Monatsschrift, 9, 596, 1955
11. Kerby G. P. "The Role of Human Platelets and  
Taylor S.M. Plasma in the Metabolism of Ade-  
nosine Diphosphate and Monophos-  
phate Added in vitro",  
Thrombosis et Diathesis Haemorr-  
hagica, Vol. XII, Nr.3/4, 510, 1964
12. Hellem A. "Adenosine Diphosphate in red Cells  
Owren P. A. as a Factor in the Adhesiveness of  
Human Blood Platelets",  
Nature, 192, 531, 1961
13. Born G. V. R. "Aggregation of Blood Platelets by  
Adenosine Diphosphate and its Re-  
versal",  
Nature, 194, 927, 1962
14. Meesen H. "Über experimentelle Lungenembolie  
durch Glasperlen",  
Archiv f. Kreislaufforschung  
6, 117, 1940
15. Nordöy A. "Platelet Thrombosis Induced by  
Chandler A. B. Adenosine Diphosphate in the Rat",  
Skandinavian Journal of Haemato-  
logy, I, 16, 1964

16. Born G. V. R. "Adenosintriphosphate (ATP) in Blood Platelets",  
Biochem. J., 62, 33, 1956
17. Øllgaard E. "Clot Retraction as a Quantitative Test of the Function and Agglomerability of the Blood Platelets",  
Acta Haematologica, Basel, 6, 220, 1951
18. Marx R. "Über den Einfluß der Erythrozyten auf die Thrombozytenadhäsion und -agglomeration",  
Folia haematologica, Neue Folge, 6, 1, 1961
19. Hubrich R. "Modellversuche zur Pathogenese der Thrombose vom Gesichtspunkt der Thrombozytenadhaesion",  
Dissertation, München, 1958  
(eingereicht August 1958)
20. Hellem H. "Demonstration of a Substance in the Rat Cells Affecting the Adhesiveness of Blood Platelets",  
Proceed. VII<sup>th</sup> Int. Congress Int. Soc. Haematology (Sept. 1958),  
2<sup>nd</sup> Vol.  
Pensiero Scientifica Publishers, Roma, S. 791
21. Born G. V. R. In "General Pathology" edit. by Florey H.W., third ed., S.248  
(Lloyd-Luke, London, 1962)

22. Born G. V. R. "Effect of Adenosine Diphosphate on the Concentration of Platelets in Circulating Blood", Nature, 197, 974, 1963
23. Nilsson J. M. "v. Willebrand's Disease and its  
Blombäck M. Correction with Human Plasma  
Jorpes E. Factor 1 - O",  
Johanson S.-A. Acta Med.Scand., 159, 179, 1957
24. Marx R. "Über eine Methode zur vergleichen-  
Derlath S. den quantitativen Bestimmung der  
Thrombozytenadhäsivität an blut-  
fremden Oberflächen unter gleich-  
zeitiger Erfassung der relativen  
Blutviskosität",  
"Blut", Zeitschrift für die gesamte  
Blutforschung, 3, 247, 1957
25. Jürgens R. "Hämorrhagische Diathesen",  
Schweizerische Med.Wochenschrift,  
36, 817, 1949
26. Marx R. Mündliche Mitteilung, 1964
27. Spaet H. "Mechanism of Platelets Plug For-  
Zucker M. mation and Role of Adenosine Di-  
phosphate",  
The American Journal of Physiology,  
6, 1267, 1964
28. O'Brien J. R. "Variability in the Aggregation of  
Human Platelets by Adrenaline",  
Nature, 202, 1188, 1964

29. Hovig T. "Aggregation of Rabbit Blood Platelets Produced in vitro by Saline 'Extract' of Tendons",  
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 9, 248, 1963
30. Schweighart E. "Studien über Thrombozytenagglutination u. Thrombozytenagglutinations-Tendenz"  
Inaugural-Dissertation, München, 1957
31. "Biochemica" Boehringer "ADP/AMP - Test"  
C.F. Boehringer und  
Soehne, Mannheim
32. Bergmeyer H. U. "Methoden der enzymatischen Analyse"  
Verlag Chemie, 1962, S. 12 u. 573
33. Dyckerhoff H. "Über die Darstellung einer toxischen Substanz (Myotoxin) aus  
Schörcher F. frischem Muskelgewebe",  
Torres I. Biochem. Zeitschrift, 300, 198, 1934
34. O'Brien J. R. "A Comparison of Platelet Aggregation Produced by five Compounds",  
in: "Fibronogen and Fibrin turnover of Clotting Factors",  
F.K. Schattauer-Verl., Stuttgart,  
S. 307
35. Spaet T. H. "Induction of Adenosin Diphosphate  
Cintron J. Release from Human Platelets by  
Connective Tissue Fragments",  
in: "Fibrinogen and Fibrin turnover of Clotting Factors",  
F.K. Schattauer-Verl., Stuttgart,  
S. 335

36. Gaarder A. "Adenosine Diphosphate in red  
Jonson J. Cells as a Factor in the Adhe-  
Laland S. siveness of Human Blood Platelets",  
Hellem A. Nature, 192, 531, 1961  
Owren P. A.

### Lebenslauf

Am 16. April 1940 wurde ich, Klaus Evertz, als Sohn des Hochfrequenztechniklers Heinz Evertz und seiner Ehefrau Erna, geborene Muchayer, in München geboren. Ab 1946 besuchte ich in München die Volksschule bis zur Beendigung des 5. Schuljahres. 1951 kam ich in das Staatliche Landschulheim Marquartstein, an dessen Oberrealschule ich 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1960/61 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Medizinstudium, legte im Sommersemester 1962 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab und bestand im Wintersemester 1962/63 das Physikum.

Ich beabsichtige, im Wintersemester 1965/66 das Medizinstudium in München mit dem Staatsexamen abzuschließen.







